



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA Escola Superior Agrária

**Caracterização do gene *gip* de *Phytophthora cinnamomi*
Rands associado à doença da Tinta do castanheiro e pesquisa
de novos fitofármacos no controlo da doença**

Maria de Fátima Tomé Martins

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientado por:

Prof. Doutor Altino Branco Choupina
Prof. Doutora Maria João Sousa

Bragança

2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança e contou com o apoio dos Projectos: **PTDC/AGR – AAM/67628/2006: Identificação, caracterização e papel de factores moleculares associados ao mecanismo de infecção de espécies de Fagaceae por *Phytophthora cinnamomi* e COMBATINTA/SP2.P11/02 Interreg IIIA.**

*À memória do meu querido Pai,
À minha querida Mãe e Irmãos,
A eles devo tudo aquilo que sou...*

Agradecimentos

Embora este trabalho seja pessoal, não é o fruto do esforço de uma só pessoa. É com muita humildade e com o maior gosto, que agradeço às pessoas, que deram o seu valioso contributo para que esta tese se concretizasse.

Em primeiro lugar, ao Professor Doutor Altino Choupina, pelo acompanhamento e orientação deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos. Agradeço a dedicação, o incentivo, a disponibilidade demonstrada.

À Professora Doutora Maria João Sousa por ter aceite ser minha co-orientadora pela simpatia, disponibilidade e ajuda no trabalho escrito.

À Professora Doutora Eugénia Gouveia, pela simpatia e disponibilidade demonstrada ao fornecer a matéria-prima do meu trabalho, o isolado de *Phytophthora cinnamomi* (Pr120).

Ao Professor Doutor Rui Abreu agradeço a simpatia, boa disposição e ajuda na parte prática com os géis de proteínas.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular; Professora Lurdes Jorge, Ivone Martins, Rodrigo Costa, Inês Dias e aos que vão passando, pela boa disposição e pelo bom ambiente de trabalho proporcionado.

Aos colegas Ricardo Malheiro, Eric Pereira, pelo poio incentivo e boa disposição sempre demonstrada.

Aos amigos Madalena Vaz, Valentim Coelho e especialmente, ao Hélio Belo, a quem devo esta tese, agradeço o estarem presentes nos bons e nos maus momentos, os conselhos, o incentivo e apoio. Obrigado pelos bons momentos passados, que ajudavam a superar as dificuldades do trabalho e ficarão guardados na memória.

À minha família que não poupou esforços na minha formação, especialmente pelo amor, carinho, dedicação e incentivo constante e pelo apoio em mais este passo da minha vida.

A todos que directa e indirectamente me ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Uma característica notável da interacção entre plantas e microrganismos patogénios de espécies de *Phytophthora* é a produção de proteínas inibidoras de glucanases (GIP) relacionadas com a doença da Tinta do castanheiro.

Dada a grande importância do castanheiro (*Castanea sativa* Mill) ao nível da economia e ecologia na região do Nordeste Transmontano, tornou-se necessário melhorar o conhecimento sobre os mecanismos de infecção de *Phytophthora cinnamomi* Rands, através do estudo da proteína GIP como mecanismo de resposta a proteínas hidrolíticas, endo- β -1,3-glucanases por parte da planta.

Este estudo, teve como objectivo clonar o gene *gip* e avaliar a expressão por gel de SDS-PAGE em diferentes tempos de indução e determinar em qual dos substratos naturais utilizados existe maior expressão por RT-qPCR.

Paralelamente foram efectuados biotestes com plantas *Castanea sativa* Mill e com *Phytophthora cinnamomi* de modo a estudar a capacidade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de *Mentha pulegium* L.

Os resultados deste estudo revelaram que a clonagem foi bem sucedida após a visualização em gel de agarose 0.8 % (v/v) de uma banda de 5369pb e outra de 940pb corresponde ao vector pET-28a(+) e á ORF do gene *gip*. A expressão da proteína verificou-se às 8 horas de indução pela presença de uma banda 31kDa observada por gel SDS-PAGE. A análise da expressão por RT-qPCR indicou que a expressão do gene *gip* é maior quando o patogénio cresce na presença de serrim 0.2 % (p/v) como substrato indutor.

Os ensaios com óleos essenciais extraídos de *Mentha pulegium* L revelaram que a *P. cinnamomi* é inibida a uma concentração de 80 % (v/v), na qual a planta se mantém viável e a sua sobrevivência não é afectada. Desta forma o uso deste produto natural como agente activo é de grande importância, especialmente nas regiões que têm soutos como recursos naturais, de grande valor económico, podendo vir a ser uma alternativa ao controlo de *P. cinnamomi*.

Palavras-chave: Castanheiro, *Phytophthora cinnamomi* Rands, GIP, *gip*, RT-qPCR, SDS-PAGE, Plasmídios, clonagem, Óleos essenciais, *Mentha pulegium* L.

ABSTRACT

A remarkable characteristic of the interaction between plants and pathogen microorganisms of *Phytophthora* species is the production of inhibitory proteins of glucanases (GIP) related with the chestnut ink disease.

Due to the great importance of the chestnut (*Castanea sativa* Mill) at economical and ecological levels in the Nordeste Transmontano region, became necessary to improve the knowledge about the infection mechanisms of *Phytophthora cinnamomi* Rands, through the study of GIP proteins, as a response mechanism to hydrolytic proteins, endo- β -1,3-glucanases, by the plant.

In the present study was intended to clone the gene *gip* and to evaluate the expression by SDS-PAGE gel in different induction times and to determine in which natural substrates used there is a higher expression for RT-qPCR.

At the same time were carried out bioassays with *Castanea sativa* Mill plants and *Phytophthora cinnamomi* in order to study the antimicrobial activity of the essential oils extracted from *Mentha pulegium* L.

The results obtained revealed that the cloning was well succeeded after the visualization in a agarose 0.8 % (v/v) gel of two bands of 5369pb and 940pb corresponding respectively to the vector pET-28a(+) and to the ORF of the *gip* gene. The protein expression was observed at 8 hours of induction by the presence of a band of 31kDa in a SDS-PAGE gel. The analysis of expression by RT-qPCR shown that the expression of the *gip* gene is higher when the pathogen grows in the presence of 0.2 % sawdust (w/v) as a inductor substrate.

The essential oils extracted from *Mentha pulegium* L. revealed that *P. cinnamomi* is inhibited in a concentration of 80 % (v/v), in which the plant remains viable and its survival is not affected. By this way the use of this natural product as an active agent if of great importance, specially in the regions that have chestnut orchards as natural resources, with high economical value, and may ultimately be an alternative way in the control of *P. cinnamomi*.

Keywords: Chestnut, *Phytophthora cinnamomi* Rands, GIP, *gip*, RT-qPCR, SDS-PAGE, Plasmid, cloning, essential oils, *Mentha pulegium* L.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micélio de *Phytophthora cinnamomi*.

Figura 2. Castanheiro com sintomas da doença da Tinta.

Figura 3. Estrutura do vector de replicação pGEM[®]-T Easy.

Figura 4. Imagem da ORF do gene *gip* e o local onde foram desenhos os *primers*.

Figura 5. Marcador de peso molecular (Promega) com a indicação dos tamanhos (pb).

Figura 6. Marcador de peso molecular (Promega) com a indicação dos tamanhos (pb).

Figura 7. Estrutura do vector de clonagem bacteriana pET-28a(+)com indicação dos sítios de restrição, incluindo os locais de clonagem múltipla.

Figura 8. (A) Extracção de DNA genómico de *Phytophthora cinnamomi* e o marcador de 1Kb. (B) Amplificação de um produto de PCR de 940pb correspondente à ORF do gene *gip* e respectivo marcador.

Figura 9. Digestão do clone pGEM[®]-T Easy/*gip* com as enzimas *Sac I* e *Hind III* e o respectivo marcador de 1Kb.

Figura 10. Extracção de plasmídios recombinantes. (M) Marcador de peso molecular (10000pb); (1) Vector pET-28a(+); (2, 3, 4, 5) Plasmídios recombinantes.

Figura 11. Digestão enzimática dos plasmídios recombinantes. (M) Marcador de peso molecular 1Kb; (1) Plasmídio pET-28a(+) sem digerir; (2, 3, 4) Digestão prova feitas com a enzima *Xho I*; (5) Plasmídio pET-28a(+) digerido; (6) Fragmento do gene *gip* libertado por digestão enzimática.

Figura 12. Marcador de proteínas com a indicação dos tamanhos de cada banda (kD).

Figura 13. Visualização da expressão de proteína em gel poliacrilamida/SDS (15 %). (M) Marcador; (1) *E. coli* sem indução; (2) Clone pETgip com indução; (3) Clone pETgip sem indução.

Figura 14. RNA de *Phytophthora cinnamomi* ao fim de 8 dias de crescimento em meio de cultura com substratos indutores. (1) Glucose 2.0 % (v/v); (2) Celulose 0.2 % (v/v) e (3) Serrim 0.2 % (v/v).

Figura 15. Curva padrão baseada nas diluições de DNA.

Figura 16. Curva de dissociação realizada para verificar a existência de contaminantes.

Figura 17. Quantificação relativa do gene *gip* por qPCR, em glucose 2.0 % (v/v); celulose 0.2 % (v/v); serrim 0.2 % (v/v).

Figura 18. Substratos indutores e expressão do gene *gip*.

Figura 19. Crescimento em placa de *Phytophthora cinnamomi* na presença de óleos essenciais de *Mentha pulegium* durante 4 semanas. (A) Controle; (B) 10 % (v/v) em óleos; (C) 20 % (v/v) em óleos; (D) 50 % (v/v) em óleos.

Figura 20. Crescimento de *Phytophthora cinnamomi* na presença de óleos essenciais de *Mentha pulegium*.

Figura 21. (A) Crescimento de *Phytophthora cinnamomi* na presença de óleos essencial de *Mentha pulegium*, em meio PDA. (1) 100 % (v/v) em óleos; (2) 80 % (v/v) em óleos; (3) e (B) em PDB.

Figura 22. Imagem das plantas *in vitro* após 4 semanas de crescimento. (A) Controle em 70 % (v/v) de etanol; (B) 2 % (v/v); (C) 10 % (v/v) em óleo; (D) 50 % (v/v); (E) 100 % (v/v) em óleo.

Figura 23. Morte das plantas micropropagadas na presença de óleos essenciais de *Mentha Pulegium*.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Programa de PCR utilizado para a amplificação da ORF do gene *gip* com os *primers* SacGIP e HindGIP.

Tabela 2. Condições físicas usadas na reacção de qPCR para os genes *gip* e *act 2*.

Tabela 3. *Primers* utilizados no qPCR. Na coluna da esquerda está representado o gene para o qual se efectuou qPCR ao qual correspondem os respectivos *primers forward, reverse*. Todos os *primers* estão descritos na orientação 5'-3'.

Tabela 4. Descrição da composição percentual dos compostos identificados por cromatografia gasosa (GC).

LISTA DE SIGLAS

% (p/v) percentagem expressa em peso por volume

% (v/v) percentagem expressa em volume por volume

Act 2 - gene actina em *Phytophthora cinnamomi*

D.O - densidade óptica

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNases - Desoxirribonuclease

DNTPs - 5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo

EDTA - ácido etilenodiamino-tetraacético ético

EPA-US - Agência de Protecção Ambiental-Estados Unidos, do inglês United States Environmental Protection Agency)

FID- detectores de ionização de chama do inglês “flame ionization detector”

g - grama

GC - cromatografia gasosa abreviatura de “Gas Chromatography”

gip- gene *gip* em *Phytophthora cinnamomi*

GIP- Proteína Inibidora de Glucanases

ha- hectare

IPTG - isopropil-β-D-galactosidase

Kb - quilobase

kDa - quilodalton

LB - meio de Lúria-Bertani

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica, do inglês “National Center for Biotechnology Information”

ORF - grelha de leitura aberta, do inglês, “open reading frame”

PAGE - eletroforese em gel poliacriláida abreviatura de “polyacrylamide gel”

Pb - pares de base.

PCR - reacção em cadeia da polimerase abreviatura de “Polymerase chain reaction”

PMSF - flúor fenilmetilsulfonil

Primer - oligonucleótido iniciador

RNA - ácido ribonucleico, do inglês, “ribonucleic acid”

RNase - Ribonuclease

RT- Transcrição reversa, do inglês “Reverse transcription”

RT-qPCR - Transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real, do inglês “quantitative real time polymerase chain reaction”

SDS - dodecilsulfato de sódio, do inglês “sodium dodecyl sulphate”

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

TCA - Ácido tricloroacético, “trichloroacetic acid”

TEMED N, N, N', N'- tetrametilietilenodiamina

U - unidade enzimática

ÍNDICE GERAL

RESUMO	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE SIGLAS	x
ÍNDICE GERAL	xii
1 - Introdução Geral	1
1.1 - Doença da Tinta do castanheiro.....	1
1.2 - Parasitas associados à doença da Tinta do castanheiro	2
1.3 - O género <i>Phytophthora</i>	2
1.4 - Biologia e ecologia de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	4
1.5 - GIPs Proteínas inibidoras de glucanases	6
1.5.1 - O papel da proteína inibidora de glucanases (GIP) em Oomicetas	6
1.5.2 - Gene <i>gip</i> em <i>Phytophthora cinnamomi</i>	7
1.6 - A utilização de fármacos no controlo da doença da Tinta do castanheiro	8
1.6.1 - Breve introdução histórica	8
1.6.2 - Propriedades de óleos essenciais de plantas silvestres	10
1.6.3 - Óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i> L. no controlo do parasita <i>Phytophthora cinnamomi</i>	11
2 - Objectivos	12
2.1 - Objectivo geral	12
2.2 - Objectivos específicos:	12
3 - Material e Métodos	13
3.1 - Microrganismos utilizados	13
3.2 - Manutenção e conservação de microrganismos	13
3.2.1 - Manutenção e conservação do patogénio <i>Phytophthora cinnamomi</i>	13
3.2.2 - Condições de crescimento de bactérias <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	13
3.2.3 - Manutenção e conservação das estirpes bacterianas e dos plasmídios	14
3.2.4 - Preparação de células competentes	14
3.3 - Clonagem da ORF do gene <i>gip</i> no vector pGEM®-T Easy	14
3.3.1 - Extracção de DNA de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	15
3.3.2 - Quantificação de DNA genómico de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	16

3.3.3 - Amplificação por PCR da ORF do gene <i>gip</i>	16
3.3.4 - Visualização e purificação de produtos de PCR por gel de agarose <i>low melting</i> 0.8 % (p/v).....	18
3.3.5 - Ligação da ORF do gene <i>gip</i> no vector pGEM®-T Easy e transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	19
3.3.6 - Extração e quantificação do DNA plasmídico	19
3.4 - Clonagem do fragmento <i>gip</i> no vector de expressão pET-28a(+).	20
3.4.1 - Digestão do vector pET-28a(+) e da ORF do gene <i>gip</i> com enzimas de restrição	21
3.4.2 - Extração do DNA e purificação por banda em gel de agarose 0.8 % (p/v) <i>low melting</i> da ORF do gene <i>gip</i> e pET-28a(+)	22
3.4.3 - Ligação da ORF do gene <i>gip</i> no vector pET-28a(+) e transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	22
3.4.4 - Rastreio das bactérias transformadas com o vector pET28a(+).	22
3.5 - Análise da expressão da proteína GIP por SDS-PAGE.....	23
3.5.1 - Indução da expressão da proteína GIP	23
3.5.2 - Preparação de proteínas a partir do meio de cultura	23
3.5.3 - Preparação de proteínas a partir de lisados bacterianos	23
3.5.4 - Quantificação da proteína GIP	24
3.5.5 - Análise da proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	24
3.5.6 - Detecção não específica de proteínas por coloração com o azul brilhante de Coomassie	25
3.6 - Crescimento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em meios de cultura com diferentes substratos indutores.....	25
3.6.1 - Extração e análise de RNA de <i>Phytophthora cinnamomi</i> crescido em meios com diferentes substratos indutores.	25
3.6.2 - Quantificação do RNA de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	26
3.6.3 - RT-qPCR.....	27
3.6.4 - Síntese de cDNA de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	27
3.6.5 - qPCR na análise de expressão do gene <i>gip</i> de <i>Phytophthora cinnamomi</i> ...	27
3.7.1 - <i>Mentha pulegium</i> L.	29
3.7.2 - Plantas micropropagadas de castanheiro <i>Castanea sativa</i> Mill.....	29
3.7.3 - Extração de óleos de <i>Mentha pulegium</i> e identificação dos compostos por cromatografia gasosa (GC).....	30
3.7.5 - Avaliação do crescimento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> na presença de óleos essenciais de <i>Mentha pulegium</i>	31

4 - Resultados e Discussão.....	32
5 – Conclusão	46
6 – Referências Bibliográficas	47
7 – Anexos.....	54

1 - Introdução Geral

1.1 - Doença da Tinta do castanheiro

Ao longo dos últimos séculos assistiu-se a uma regressão das áreas de ocupação do castanheiro (*Castanea sativa* Mill) no Norte da América e na Europa. Associada a esta regressão está a doença da Tinta do castanheiro, sendo considerada como uma das principais causas do desaparecimento do castanheiro. Na América a doença apareceu em 1904 no leste americano levando a morte milhares de castanheiros. Na Europa o começo desta regressão é bastante anterior à americana, no entanto, desde o seu aparecimento a doença expandiu-se com grande rapidez destruindo milhões de castanheiros (Cortizo *et al.*, 1999).

A doença da Tinta do castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill) surgiu em Espanha em 1726, (Crandall, 1950). Em 1859 verificou-se o aparecimento de sintomas da doença da Tinta em castanheiros no Norte de Itália, nas províncias da Toscana, Piemonte e Ligúria, em França, nas regiões de *Gard*, *Lozère* e Baixos Pirenéus (Elorrieta, 1949).

Em Portugal, os primeiros sintomas foram registados por volta de 1838 nas margens do rio Lima, verificando-se amarelecimento e queda prematura das folhas e o aparecimento de uma podridão húmida nas raízes que mais tarde conduzirá à morte da árvore (Fernandes, 1953).

A área de ocupação do castanheiro em Portugal tem vindo a sofrer um decréscimo acentuado desde que esta doença se instalou. O avanço da doença tem sido de tal forma devastador, que hoje praticamente não existem castanheiros no Minho e as áreas de ocupação regrediram em mais de 50 % em Trás-os-Montes e Beira Alta, regiões onde existem ainda os maiores sotos de castanheiro. No fim do século XX a área de castanheiro diminuiu de 60000 ha para 20000 ha (Abreu, 1995).

A doença da Tinta que invariavelmente provoca a morte do castanheiro é uma doença endémica em todas as regiões castaneícolas. Na região de Trás-os-Montes estima-se que 15 % das árvores são afectadas pela doença mesmo nas regiões de maior aptidão para o castanheiro como a Terra Fria Transmontana (Carvalheira, 1997; Martins *et al.*, 1997).

1.2 - Parasitas associados à doença da Tinta do castanheiro

À doença da Tinta do castanheiro estão associadas duas espécies do género *Phytophthora*, *Phytophthora cinnamomi* Rands e *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman que de forma sistemática têm atingido todas as regiões castaneícolas do país e do mundo. Em Portugal, a espécie *P. cinnamomi* é a mais frequentemente isolada e por isso considerada a espécie preponderante no desenvolvimento da doença (Fernandes, 1966, Gouveia, 2004).

P. cinnamomi foi descrita pela primeira vez em 1922, por Rands, na ilha de Sumatra, após ter sido detectada na árvore da canela (*Cinnamomi burmamii* Blume) (Zentmyer, 1980). Desde então, foi registada a sua presença em mais de 70 países e em quase 1000 hospedeiros os quais são predominantemente plantas lenhosas (Roberts & Boothroyd, 1984). Os hospedeiros principais incluem o abacateiro, o eucalipto, o ananaseiro, o castanheiro, varias espécies de pinheiro, muitas plantas ornamentais, e ainda um número elevado de plantas nativas da Austrália.

P. cinnamomi é considerada como um dos patógenos mais destrutivos e versáteis, sendo o que possui maior distribuição geográfica e maior número de hospedeiros susceptíveis à sua acção (Vieitez *et al.*, 1999).

Este parasita foi isolado do castanheiro pela primeira vez, no nosso país, em 1941 por Moniz da Maia e mais tarde confirmado por Pimentel em 1942 que também isolou e identificou *P. cinnamomi* e *P. cambivora* de castanheiros com sintomas da doença (Pimentel, 1947).

1.3 - O género *Phytophthora*

Phytophthora pertence a um grupo de transição entre os fungos inteiramente aquáticos e completamente terrestres. Isto reflecte-se na complexidade do seu ciclo de vida. Este organismo é dependente das condições de humidade para a sua sobrevivência, mas têm a capacidade de esporulação, dispersão, infecção e é capaz de adoptar várias estratégias de adaptação às alterações edáfoclimáticas (Shearer, 1989).

Caracteriza-se em termos biológicos por possuir micélio cenocítico (alguns septos podem estar presentes em culturas mais velhas), as hifas são hialinas podendo ter uma aparência lisa, nodosa ou botriosa e ramificações laterais apresentam geralmente uma ligeira constrição na base (Figura 1), (Gouveia, 2004).

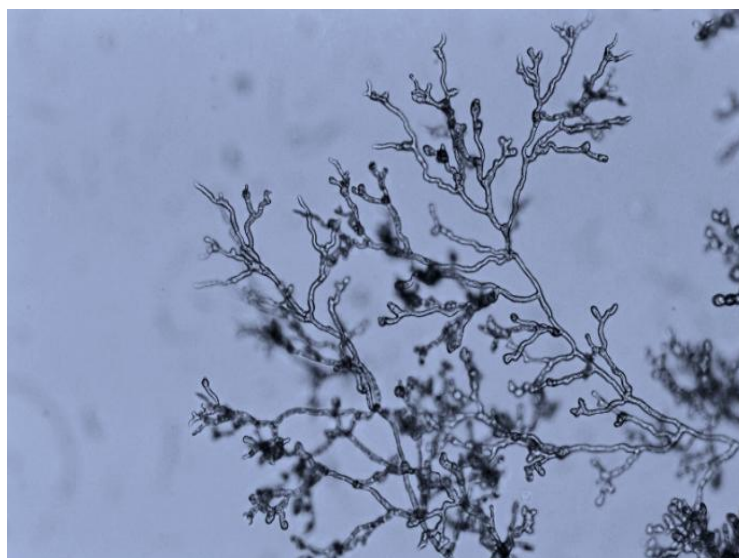


Figura 1. Micélio de *Phytophthora cinnamomi*.

O género *Phytophthora* é constituído por 64 espécies, tendo sido recentemente descritas novas espécies, como: *Phytophthora kernoviae* sp. nov (Clive *et al.*, 2005), *Phytophthora austrocedri* (Greslebin *et al.*, 2007), *Phytophthora asparagi* (Saude *et al.*, 2008), *Phytophthora rosacearum*, *Phytophthora sansomeana*, (Hansen *et al.*, 2009) e *Phytophthora morindae* (Nelson & Abad, 2010), todas elas com capacidade de causar infecção em vários hospedeiros, podendo causar uma série de doenças em diferentes espécies vegetais.

O género *Phytophthora* foi tradicionalmente classificado no reino *Fungi*, por se tratar de organismos: 1) heterotróficos, 2) crescimento por polarização das hifas, 3) esporos vegetativos adaptados à dispersão pelas correntes de ar ou pela água e 4) utilizarem estratégias de infecção das plantas semelhantes às dos fungos. No entanto, em *Phytophthora*, sempre foram reconhecidas características biológicas e fisiológicas que lhe conferiam singularidade no contexto do reino onde estava inserida, e que foram sucessivamente ampliadas com estudos posteriores (Gouveia, 2004).

Em 1987 constatou-se que organismos classificados como *Phytophthora* possuíam zoósporos que produziam parede celular no decorrer do processo de enquistamento necessário para poderem germinar e causar infecção; os zoósporos possuíam dois flagelos com morfologia diferente; em cada oogónio era formado apenas um oósporo; a parede celular era constituída por glucano e alguma celulose, contrariamente aos fungos

em que a quitina era o principal constituinte; durante a fase vegetativa eram organismos diplóides, enquanto que os fungos eram haplóides (Zentmyer, 1987).

Verificou-se que acumulavam micolaminarinas (β e 1-3-glucanas e manitol) como substâncias de reserva, enquanto os fungos acumulavam o manitol e não sintetizavam esteróis, razão pela qual não seriam sensíveis aos fungicidas que interferiam com a sua biossíntese (Zentmyer, 1987).

A classificação taxonómica do género *Phytophthora* é baseada essencialmente em características morfológicas. Estas apresentam elevada plasticidade e são em número reduzido face ao elevado número de espécies descritas, tornando a classificação e identificação um processo difícil, laborioso e muito moroso (Gouveia, 2004).

O Género *Phytophthora* pertence à classe dos Oomicetas, sendo por vezes referido como um organismo fúngico mas como se encontra actualmente classificado por Dick (1995) num reino completamente diferente, o Reino *Stramenopila*, anteriormente denominado *Chromista* por Cavalier-Smith (1986) caracteriza-se como um exemplo de evolução convergente; *Phytophthora* é morfológicamente muito semelhantes aos fungos verdadeiros, embora a sua história evolutiva seja muito distinta.

Em contraste com fungos, *Stramenopila* são mais estreitamente relacionados às plantas do que animais, desta forma atribui-se assim significado às singularidades biológicas, fisiológicas, bioquímicas do género *Phytophthora* (Dick, 1995).

1.4 - Biologia e ecologia de *Phytophthora cinnamomi*

P. cinnamomi é um patógeno do solo que depende de condições de humidade favoráveis para a sua sobrevivência, esporulação e dispersão (Shearer & Tippet, 1989).

Na Primavera e Outono as condições quentes e húmidas observadas no solo e a presença de tecido susceptível favorecem a fase de expansão de *P. cinnamomi*. Durante a época em que as condições lhe são desfavoráveis, humidade baixa, ausência de tecido susceptível e actividade microbiana elevada, o microrganismo possui a capacidade de permanecer no solo, por longos períodos de tempo, devido à desintegração das hifas que libertam os esporângios, estruturas de resistência, especializados em sobrevivência (Gouveia & Abreu, 1994).

P. cinnamomi reproduz-se produzindo dois tipos de esporos, quando as condições são desfavoráveis produz esporos grandes e capazes de resistir durante longos períodos de tempo (clamidósporos) e em ambiente favorável produz zoósporos em largo número,

flagelados, com mobilidade no solo húmido ou encharcado. Quando encontram as extremidades de raízes finas, os zoósporos produzem tubos de germinação que penetram nos tecidos da raiz. O micélio cresce dentro das raízes, ou de raiz para raiz nos pontos de contacto, sendo esta uma das formas de disseminação do fungo, (Vidhyasekaran, 1997).

Clamidósporos são propágulos de longa vida que permitem ao patogénio persistir no solo e em condições propícias ao seu desenvolvimento provocam nova infecção (Vidhyasekaran 1997; Hardham 2005; MacCarren *et al.*, 2005). Os zoósporos são considerados o principal agente infeccioso de *P. cinnamomi*, sendo capazes de distinguir raízes viáveis de tecidos mortos, usando indicadores, que podem ser responsáveis pela selecção dos locais de infecção na superfície da raiz. O patogénio também reconhece o hospedeiro por propriedades físicas e químicas dos tecidos, tais como aminoácidos (aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, arginina e metionina) que formam a superfície do tecido vegetal (Tyler, 2002). Ao ultrapassar todas as barreiras o patogénio instala-se no hospedeiro e os sintomas externos mais evidentes surgem na parte superior da copa progredindo de cima para baixo, a partir da extremidade dos ramos (Figura 2).



Figura 2. Castanheiro com sintomas da doença da Tinta.

Na parte aérea observam-se: clorose, emurchecimento, dessecamento rápido das folhas e flor que afectam a formação dos ouriços que muitas vezes ficam aderentes à árvore, os frutos são de pequenas dimensões e sem características organolépticas, podendo mesmo ocorrer o seu aborto (Fernandes 1966; Carvalheira 1997).

Ao longo do desenvolvimento da doença, observa-se ao nível da epiderme dos ramos das pernas principais e colo da árvore, uma coloração escura com contornos irregulares do qual se salienta o aparecimento de um líquido escuro, semelhante à tinta de escrever, a este tipo de sintomas deu-se o nome vulgar da doença da Tinta, que se deve à oxidação das substâncias fenólicas que se libertam devido ao crescimento dos tecidos sãos que dilaceram os tecidos doentes (Fernandes, 1966).

P. cinnamomi pode sobreviver em material vegetal morto, a fase saprofítica pode levar a um aumento na população do patógeno, embora espécies de *Phytophthora* tenham uma capacidade saprofítica limitada o que significa que apresentam crescimento pobres e de baixa capacidade competitiva à presença de outros microrganismos do solo, (Cahill, 1993). A habilidade de *P. cinnamomi* para sobreviver como estruturas latentes durante muitos anos faz o seu controlo em ambientes naturais difícil de alcançar (Erwin & Ribeiro, 1996).

O seu controlo por métodos químicos e por desenvolvimento de variedades resistentes tem-se mostrado ineficaz pelo que o desenvolvimento de formas alternativas de controlo da doença assume grande importância (Saleses *et al.*, 1993; Abreu *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, a investigação ao nível da biologia molecular têm permitido o desenvolvimento de novos conhecimentos sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela patogenicidade e no combate de doenças associadas a este patógeno.

1.5 - GIPs Proteínas inibidoras de glucanases

1.5.1 - O papel da proteína inibidora de glucanases (GIP) em Oomicetas

As plantas utilizam uma grande variedade de estratégias para se defenderem de microrganismos patogénicos. O desenvolvimento de mecanismos de defesa constitutiva, tais como, a secreção de enzimas hidrolíticas que degradam polissacáridos da parede celular constitui um papel fundamental na redução da potencial invasão de patógenos (Ingo Hein *et al.*, 2009).

Os principais constituintes da parede celular de Oomicetas são glucanos e quitina, embora diferentes grupos taxonómicos possam apresentar composição substancialmente diferente (Ingo Hein *et al.*, 2009).

Uma característica notável da interacção entre plantas e microorganismos patogénicos é a secreção de proteínas inibidoras de glucanases (GIP) como mecanismo de resposta a proteínas hidrolíticas, endo- β -1,3-glucanases (Kamoun, 2006).

A secreção de endo- β -1,3-glucanases permite tanto à planta quanto ao Oomiceta degradar o β -1,3 glucano, presente na parede celular (Kauffman *et al.*, 1987; Stintzi *et al.*, 1993) sendo esta uma resposta que representa um mecanismo de defesa tanto por parte da planta como do patogénio (Van Loon *et al.*, 2006).

A identificação de novas famílias de GIP em *P. sojae*, *P. ramorum* e *P. infestans* (Tyler *et al.*, 2006) permitiu analisar a sua evolução, de modo, a demonstrar que as GIPs possuíam homologia com a classe das quimiotripsinas, serinas protease (SP) pertencendo à subfamília S1A. No entanto verificou-se que estas não possuíam actividade proteolítica devido à falta do domínio His-Asp-Ser pelo que foram incluídas na classe das proteínas homólogas das serinas proteases (Rose *et al.*, 2002; York *et al.*, 2004).

Desde a recente identificação de GIPs, os estudos centram-se na caracterização bioquímica, abordagem de características tais como propriedades de ligação e especificidade do ligando (Rose *et al.*, 2002 ; York *et al.*, 2004).

Sendo as GIPs proteínas inibidoras de glucanases com grande interesse ao nível da patogenicidade e da resposta da planta hospedeira, torna-se necessário compreender os mecanismos moleculares inerentes as estas proteínas.

1.5.2 - Gene *gip* em *Phytophthora cinnamomi*

Em *P. cinnamomi* foi descrito anteriormente um gene *gip* (GenBank, código AM259384) que apresenta um tamanho total de 1141pb, uma ORF (grelha de leitura aberta) de 810 nucleotídeos e 269 aminoácidos. A amplificação do gene foi feita recorrendo a *primers* degenerados concebidos com base na homologia de quadros de leitura abertos de outras GIPs (*Phytophthora sojae*) e recorrendo à técnica de TAIL-PCR, uma ferramenta simples e poderosa usada para a recuperação de fragmentos de DNA genómico desconhecido adjacentes às sequências conhecidas (Michiels *et al.*, 2003). Este gene codifica para uma proteína que promove a inibição da acção de

endoglucanases envolvidas nas respostas de defesa da planta suprimindo assim a degradação de glucanos na parede celular do Oomiceta.

As GIPs, são caracterizadas como proteínas que degradam polissacarídeos e que são susceptíveis de influenciar interacções planta-patógeno. No entanto, o seu significado biológico não foi ainda estabelecido, muitas questões permanecem ao nível molecular, tais como a identidade dos domínios e de resíduos de proteínas chave do inibidor que contribuem para a especificidade de reconhecimento (Cynthia M. B *et al.*, 2008).

Com este trabalho pretende-se clonar o gene que codifica para a GIP em *P. cinnamomi* bem como avaliar a sua expressão em meios com diferentes substratos indutores de forma a tentar perceber interacções planta-patógeno contribuindo de alguma forma para o conhecimento sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela patogenicidade.

Nota: O gene *gip* depositado na data base (NCBI) cujo código de acesso é AM259384, está descrito com um tamanho de 1141bp, no entanto, este gene na realidade tem um tamanho total de 1271pb, apresentando uma ORF de 940pb este facto sugere fortemente tratar-se de erros de sequenciação. Neste momento estão a fazer-se as correcções necessárias; (Autores; Carvalho, C. M. S., Meirinho, S. G. Choupina A. B, 2006)

1.6 - A utilização de fármacos no controlo da doença da Tinta do castanheiro

1.6.1 - Breve introdução histórica

A luta química no combate à doença da Tinta do castanheiro teve início em Espanha na década de 30 do século XX. O tratamento consistia em aplicar sais de cobre na zona do colo e das raízes, previamente limpas da terra aderente, o qual ficou conhecido como “Método Urquijo” (Fernandes, 1947). Este método foi seguido em Portugal por Taveira Fernandes quando foi implementado o Plano de Valorização e Defesa do castanheiro, tendo sido aplicado nas regiões onde a doença mostrava tendência para alastrar (Fernandes, 1953). Em Portugal o método de Urquijo foi amplamente usado, obtendo-se resultados de certo modo positivos mas, em contrapartida, os custos eram elevados e os efeitos ambientais negativos, pelo facto de se tratar de uma doença radicular e o tratamento ter de ser feito no solo, razões que conduziram ao abandono do método.

A aparição no mercado de compostos químicos de acção sistémica abriu e melhorou as possibilidades no combate a patógenos do género *Phytophthora*. O desenvolvimento de fungicidas sistémicos para controlar Oomicetas, nos quais estão incluídos parasitas obrigatórios como os míldios, *Phytophthora* e *Pythium* começa em 1976 com o Cimoxanil (Serre, Carraro, 1976), seguido do Metalaxil (Urech *et al.*, 1977), Furalaxil (Schwinn *et al.*, 1977), Ofurace (Lukens *et al.*, 1978), Oxadixil (Gisi *et al.*, 1983) e Fosetil-Al (Bertrand *et al.*, 1977; Williams *et al.*, 1977).

O repetido uso de Metalaxil favoreceu o aparecimento de resistências em isolados de *P. infestans* (Schwinn, 1987). Para evitar este problema, as empresas começaram a comercializar misturas de acilalaninas com fungicidas convencionais como os ditiocarbamatos e ftalamidas para uso contra patógenos das folhas (Schwinn, 1987).

Tais misturas não foram desenvolvidas para patógenos do solo porque o risco da resistência era considerado baixo. Apesar de não terem aparecido casos de resistência em espécies de *Phytophthora*, que sejam patógenos do solo, como por exemplo *P. cinnamomi* e *P. cambivora* as evidências genéticas demonstradas pela investigação em *P. infestans* sugerem que a sistemática utilização do metalaxil pode provocar um aumento da resistência nestes patógenos (Erwin & Ribeiro, 1996). Recentemente, em ensaios com fertilizantes Fosfonatos, considerados biopesticidas pela EPA-US (Agência de Protecção Ambiental-Estados Unidos) e enquadrados nos fungicidas bioquímicos, em termos regulamentares, dado o seu modo particular de acção e por serem substâncias muito frequentes no ambiente (<http://www.epa.esa.gov/pesticides/biopesticides>), verificou-se que, estes fertilizantes conferiam protecção contra *P. cinnamomi*, em algumas plantas lenhosas, onde eles foram testado (Wilkinson *et al.*, 2001; Hardy *et al.*, 2001; Barrett *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2006; Coelho, 2009), embora a sua aplicação, obviamente, não remova *P. cinnamomi* do solo.

Os meios de luta disponíveis no combate à doença da Tinta do castanheiro não têm, até hoje, resolvido de forma eficiente e duradoura os problemas sanitários das culturas, atacadas por este parasita. Sendo uma doença difícil de erradicar, actualmente estão a ser investigadas formas alternativas para o controlo desta doença.

Os óleos essenciais, são compostos naturais voláteis com um forte odor que têm vindo a ser utilizados desde a Idade Média para diversas aplicações, como bactericidas, virucidas, fungicidas e insecticida (Guimarães *et al.*, 2010), devido às potenciais características que apresentam, recentemente, foram realizados estudos para avaliar a capacidade do controlo de espécies de *Phytophthora*.

Como alternativa aos fungicidas sintéticos foram feitos estudos com óleos essenciais, utilizados no controlo do Oomiceta *Phytophthora infestans*, agente causal da doença oídio do tomateiro (Mine *et al.*, 2005). O anti-fúngico de óleos essenciais foi obtido de partes aéreas de plantas aromáticas, como orégão (*Origanum syriacum* var. *bevanii*), tomilho (*Timbra spicata* subsp. *Spicata*), lavanda (*Lavandula* subsp. *stoechas*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), funcho (*Foeniculum vulgare* Mill) e loureiro (*Laurus nobilis*). O estudo revelou que os óleos essenciais afectam a taxa de crescimento do micélio, e a produção de esporângios (Mine *et al.*, 2005).

A observação em microscopia electrónica indicou que as hífis do patogénio, expostas aos óleos essenciais apresentam alterações morfológicas, como a coagulação citoplasmática, hífis enroladas e rebentamento de protoplastos (Mine *et al.*, 2005). Também para *P. infestans* foram testadas condições *in vitro* e em estufa, recorrendo a 19 óleos essenciais de plantas silvestres onde se verificou que ocorria inibição do desenvolvimento do patogénio (Quintanilla *et al.*, 2002).

1.6.2 - Propriedades de óleos essenciais de plantas silvestres

Os óleos essenciais são compostos líquidos, voláteis, lípidos e solúveis em lípidos e em solventes orgânicos, com uma densidade geralmente mais baixa do que a da água. Podem ser sintetizados por vários órgãos da planta: botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares, (Bakkali *et al.*, 2008).

Os componentes dos óleos essenciais são principalmente monoterpenos e sesquiterpinos, que são hidratos de carbono com a fórmula química geral $(C_5H_8)_n$, (Svoboda, K. P & Hampson, J. B., 1999). Compostos oxigenados derivados desses hidratos de carbono incluem álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos. Estima-se que existem mais de 1000 monoterpenos e 3000 estruturas sesquiterpénicas. Outros compostos incluem fenilpropenos e compostos específicos contendo enxofre ou azoto, (Svoboda, K. P & Hampson, J. B., 1999). Na natureza, desempenham um papel importante na protecção das plantas, como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, insecticidas e também contra herbívoros, reduzindo o seu apetite para tais plantas, podendo também ter o efeito de atracção de alguns insectos que favoreçam a dispersão do pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis (Bakkali *et al.*, 2007).

1.6.3 - Óleo essencial de *Mentha pulegium* L. no controlo do parasita *Phytophthora cinnamomi*

A *Mentha pulegium* L. caracteriza-se por ser uma espécie herbácea vivaz, de 20 a 40 cm de tamanho, subprostrada, subglabra a tomentosa, fortemente aromática, de folhas pequenas (8 a 30 mm), elíptico-oblongas, atenuadas na base, curtamente pecioladas, inteiras ou esparsamente dentadas, pilosas na página virada para o caule; inflorescências em verticilastros esféricos com entrenós visíveis, cálice de dentes ciliados; corola de cerca de 5 mm de tamanho, lilacínea, estames excertos; mericarpos com 0,7 mm, acastanhados (Cunha *et al.*, 2007). É uma espécie de lameiros e da beira-rio, ocorrendo fundamentalmente ao longo das valas. Contudo, é possível encontrá-la ainda nas beiras de caminhos que permanecem húmidos durante parte do ano.

Esta planta silvestre que cresce espontaneamente em grande quantidade na região do Nordeste de Portugal e sendo fácil de identificar é usada neste trabalho com o objectivo de avaliar a sua capacidade antimicrobiana no controlo de *P. cinnamomi*.

A perspectiva do uso deste produto natural como agente activo é de grande importância, especialmente nas regiões que têm soutos como recursos naturais, de grande valor económico. Na região do Nordeste, o recurso a óleos essenciais extraídos de *Mentha pulegium*, poderá vir a ser uma alternativa ao controlo de *P. cinnamomi*, inibindo o seu crescimento e consequentemente propagação em células vegetais.

2 - Objectivos

2.1 - Objectivo geral

O objectivo geral desta tese consistiu em melhorar os conhecimentos sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi* Rands, associada à doença da Tinta do castanheiro, através da clonagem molecular do gene *gip*, avaliação da expressão por RT-qPCR (Transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real), bem como da proteína GIP por SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) e testar novos fitofármacos no controlo da doença.

2.2 - Objectivos específicos:

- Clonagem molecular do gene *gip* no plasmídeo pET-28a(+) e análise da expressão heteróloga da proteína GIP por gel de poliacrilamida SDS-PAGE;
- Avaliar a expressão por RT-qPCR do gene *gip* em três meios indutores, glucose 2.0 % (p/v), celulose 0.2 % (p/v) e serrim 0.2 % (p/v) (extracto de madeira de castanheiro) de diferentes tempos de crescimento (2, 4, 6 e 8 dias);
- Estudar a actividade de óleos essenciais de *Mentha pulegium* L em biotestes com plantas de castanheiro e com *P. cinnamomi*;
- Extracção de óleos essenciais por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, identificação química dos componentes maioritários por cromatografia gasosa (GC) e determinação das concentrações bioactivas em biotestes com o hospedeiro e o patogenio.

3 - Material e Métodos

3.1 - Microrganismos utilizados

- **Isolados de *Phytophthora cinnamomi***

O patógeno *P. cinnamomi* utilizado neste estudo foi obtido de castanheiros (*Castanea sativa* Mill) com sintomas de doença da Tinta, na região do Nordeste Transmontano, isolado por Gouveia (2001) e mantido na colecção de *Phytophthora* da Escola Superior Agrária de Bragança. Ao isolado foi dado o código Pr120.

- ***Escherichia coli***

Ao longo deste trabalho foi utilizada a estirpe de *Escherichia coli* DH5 α , de genótipo (*supE44*, Δ *lacU169*, (*f80lacZ* Δ *M15*), *hsd R17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) (Hanahan, 1983).

3.2 - Manutenção e conservação de microrganismos

3.2.1 - Manutenção e conservação do patógeno *Phytophthora cinnamomi*

O micélio do microrganismo filamentoso, *P. cinnamomi* foi obtido por crescimento em meio PDA (Potato Dextrose Aga), (HIMEDIA) durante cinco dias, sendo repicado periodicamente para placas de Petri com PDA e conservado a longo prazo em glicerol 30 % (v/v) em água a uma temperatura de -20 °C.

3.2.2 - Condições de crescimento de bactérias *Escherichia coli* DH5 α

As culturas bacterianas em meio líquido foram realizadas em meio de Luria Bertani (LB) com arejamento a 37 °C e a 180 rpm em agitador orbital (Stuart[®], S150). Ao meio de cultura foi adicionado antibiótico de acordo com a resistência apresentada pelos plasmídios, canamicina numa concentração de 30 μ g/ml para o pET-28a(+) (Novagen) e ampicilina numa concentração de 100 μ g/ml para o pGEM[®]-T Easy (Promega).

As colónias bacterianas foram isoladas em caixa de Petri, com LB-agar com antibiótico e quando necessário para a identificação de recombinantes foi adicionado IPTG (isopropil- β -D-galactosidase) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo) nas concentrações 100 mM e 80 ug/ml. As caixa de Petri foram incubadas durante a noite a 37 °C na estufa (MEMMERT).

3.2.3 - Manutenção e conservação das estirpes bacterianas e dos plasmídios

A estirpe bacteriana utilizada ao longo deste trabalho foi armazenada a -70 °C em criotubos de 2 ml, no respectivo meio de cultura com 1/3 do volume de glicerol 100 %. Quando se procedia ao seu uso, efectuavam-se repicagens para caixa de Petri com meio LB-agar e guardavam-se a uma temperatura de 4 °C.

O plasmídio quando purificado, para armazenamento a longo prazo mantinha-se a -20 °C e a curto prazo mantinha-se a 4 °C.

3.2.4 - Preparação de células competentes

Para a preparação de células competentes inoculou-se a estirpe de *E. coli* em LB líquido, sem antibiótico, a uma temperatura de 37 °C com agitação constante de 180 rpm até se obter uma densidade óptica (D.O) entre 0.4-0.5. Centrifugaram-se as bactérias durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente foram ressuspendidas numa solução 0.1 M MgCl₂, e mantiveram-se durante 10 minutos em gelo.

Repetiu-se a centrifugação e foram novamente ressuspendidas numa solução 0.1 M CaCl₂ contendo 15 % (v/v) de glicerol e armazenadas em alíquotas a -70 °C.

3.3 - Clonagem da ORF do gene *gip* no vector pGEM[®]-T Easy

A clonagem da ORF do gene *gip*, foi iniciada no vector pGEM[®]-T Easy, pois este é um plasmídio replicativo que recebe directamente produtos de PCR (reacção em cadeia da polimerase) e facilita posteriormente a clonagem no plasmídio de expressão pET-28a(+).

Vector de replicação de DNA

pGEM[®]-T Easy

Para a clonagem dos produtos de PCR utilizou-se o vector pGEM[®]-T Easy (Figura 3), um vector linearizado de 3015pb preparado pela casa comercial Promega por digestão com EcoRV do vector pGEM-5Zf(+) (semelhante ao pGEM[®]-T Easy mas circular), e posterior adição de uma timidina na posição 3' em cada um dos extremos. A adição de timidina na posição 3' aumenta a eficiência de ligação do produto de PCR no vector, porque a Taq polimerase deixa duas desoxiadenosinas nas extremidades 3' do fragmento de DNA sintetizado na reacção de PCR. Os clones que contêm insertos nesta região (o inserto inactiva o péptido) identificam-se directamente na ausência de cor azul em placas com X-Gal e IPTG (a cor azul é a consequência da actividade do péptido α da β -galactosidase).

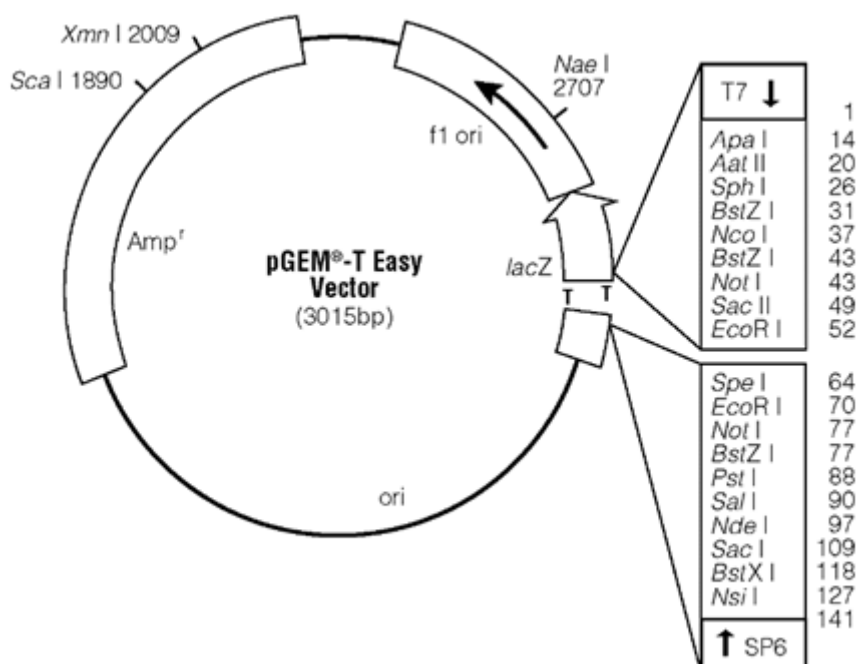


Figura 3. Estrutura do vector de replicação pGEM[®]-T Easy.

3.3.1 - Extração de DNA de *Phytophthora cinnamomi*

Existem vários métodos para a extração de DNA genómico (dependendo do tipo de amostra biológica de partida), sendo comum a todos a lise celular, seguida de desproteinização e purificação do DNA.

Para a extracção do DNA genómico de *P. cinnamomi*, cresceu em meio PDA, coberto com uma película de celofane e após 6 dias de crescimento micelial, procedeu-se á sua extracção.

O processo de extracção consistiu na utilização de uma solução de lise, Tris-HCL 200 mM; EDTA 25 mM; NaCl 250 mM e SDS 0.5 (p/v) seguido de uma desproteinização com fenol/clorofórmio/álcool isoamilico (25:24:1) e precipitação de DNA por lavagem com etanol (100 % - 70 %) a -20 °C, sendo o sedimento de DNA posteriormente dissolvido em água ultrapura. O tratamento do DNA foi feito com RNase 5 mg/ml durante 5 minutos a 37 °C.

3.3.2 - Quantificação de DNA genómico de *Phytophthora cinnamomi*

O DNA de *P. cinnamomi* foi quantificado, recorrendo-se ao doseamento espectrofotométrico. Este método baseia-se na quantidade de radiação ultravioleta absorvida pelas bases nucleotídicas constituintes das cadeias de DNA, segundo a lei *Lambert-Beer*:

$$A = c L \varepsilon$$

Onde *A* é a absorvância da solução; *c* é a concentração da solução; *L* é o percurso óptico atravessado pela radiação (1cm) e ε a absorvidade específica ($9,6 \times 10^3 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). As leituras das densidades ópticas foram efectuadas a 2 comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm, num espectrofotómetro *Genesys 10UV (Thermo electron corporation)*. O grau de pureza do DNA genómico foi calculado através da razão entre os valores de absorvância nos dois comprimentos de onda (A_{260}/A_{280}). Para que um DNA seja considerado puro, é necessário que esta razão esteja compreendida entre 1.65 e 2. Uma razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ inferior a 1.65 indica que a amostra de DNA está contaminada com proteínas, por outro lado se essa razão for superior a 2 existe uma contaminação com RNA, sais e/ou reagentes utilizados durante a extracção. Após a obtenção das leituras espectrofotométricas, fizeram-se as respectivas diluições das várias amostras de DNA, de modo a obter uma concentração final de DNA de 80 ng/μl.

3.3.3 - Amplificação por PCR da ORF do gene *gip*

Para a clonagem da ORF do gene *gip* foi necessário proceder à replicação “*in vitro*” por PCR usando *primers* com adaptadores que possuem os locais de

reconhecimento das enzimas e que após a digestão permitam inserir através de uma T4 DNA ligase (Promega) o fragmento de DNA no vector. O desenho dos *primers* foi feito tendo em conta o local de restrição no *polilinker* do vector pET-28a(+), não possuírem local de reconhecimento na ORF do gene e formarem extremos coesivos após a digestão. Deste modo escolheram-se as enzimas *Sac I* e *Hind III* (Promega), visto serem as mais apropriadas (Figura 4).

Na figura 4, encontram-se desenhados os *primers* SacGIP sentido (5'-3') **GAG CTC GAC ATG TTT ACT TCC GG**) e HindGIP sentido (3'-5') CCA **AGC TTG TCC TTA TGC CTT GAT G**), a partir da sequência nucleotídica da ORF do gene *gip* do *GenBank* (AM259384) usados para a clonagem. As bases marcadas a vermelho representam a sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Sac I* e a verde a sequência de reconhecimento da enzima *Hind III*.

```
TTTTTGAAATTCAGTAGCAAATATGAGCTCGACATGTTTACTTCCGGAAGGGCTAAACGTTCAATCCAAT
GGGCGTTTGTGAACCGCTCTTTACTCTATCTAACGTCCACCTCCTCAAGCAATGGTTATCCACCATTGCG
GAATTTACCGCGCACTGCTCACTCCATTTTCGCCATCTTCCGCTAACCATGACGGTTGTCTTCACCGTCGC
CACTGCACTCATTGTGGTGGTGCTCTCATCAGTCCCACCCACGTGCTTACCACTGCGTCATGCACGGCAT
ACGAGGAGGGCTCGTCCATCCCCCACTGGGCTGCAGTGGGCACGCACTACATCAACGGCGCGAAAGATGG
CGAGCGGATCAAGATCGTGTGACCAAGAACCACACACTATACAACTCGAGCAGTTTCTCGTACAATTTTC
GCTGTGTTGACACTTGAGAATCCAAGCAAGTTCGCCCCCGTCAAGCTCCCTAAGGCGGATGGCTCGGACA
TTTTCCCGCGCGGTGGTTCGAAGGTTATGTGCTGGGGTGATACCAGCTACCCGAACGGCAAACCCTCCGA
CGAGCTGCAGAGCGTTGACTTGAGGGTCTGGGGCGACAACGCCTGCGAAAACAAGTTCTCTGTTGGACAAG
TCGTCGTTGTGTGCTGGTGGTGATGCTGGCAAAGATTCTTGCAATTGGCGATACTGGTGATCCGCTGATCA
AGGAAAACGGCCGCGGTGACGCTGACGACATTGTCAATCGGTTTGTGCGGGCTGGGGAGCTGGTTGCGGTGA
CAAAGGCATCCCTGCTGTGTACTCTCGCGTGTCCGCTGGTATTGAGTGGATCAACTCTATCATCAAGGCA
TAAAGGACAAGCTTGGTTGGGGCACTTCGCGTTCGAATGCGTTCTGTGTTCTTTTCGCCCTTAGTTTCGCGTT
CGAGCAAGGTTGGCCCATAACAAATATTTGCTCGATGAATCACTAGGGGAAAACATTATTTGTGAAAACCA
CTTCGTTCTCACATTTTGGCTTGTAATTCATTGATCGATTTGCAAAACGATTGCGAGCTCCAACCACCTC
GGACTATCCTGATAATTCGACGATTTACGCAAGGGACGATATAGGTGCACTTGAAGCCGGATACCCACCC
ACCTTATCGTGCTGCATAATATCCATATCGCCCGCAACTTCTGACTCG
```

Figura 4. Imagem da ORF do gene *gip*, e o local onde foram desenhados os *primers*.

A mistura de reacção para amplificação da ORF do gene *gip* continha, tampão de reacção 1X (Fermentas), dNTPs 0.8 mM *primers* 1.5 pmol/μl, enzima *Taq* polimerase 1.25 unidades/reacção, MgCl₂ 1.5 mM e água para um volume total de 25 μl. A reacção de PCR foi realizada com recurso ao programa descrito na tabela 1 (Anexo II).

3.3.4 - Visualização e purificação de produtos de PCR por gel de agarose *low melting* 0.8 % (p/v)

A visualização e separação dos produtos de PCR foi realizada mediante electroforese em gel de agarose *low melting* 0.8 % (p/v) em TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), com brometo de etídeo a 0.5 µg/ml, durante 40 minutos a uma intensidade de corrente de 80 V, tendo-se controlado 25 µl de produto amplificado ao qual se adicionou 4µl de *Orange blue* 6x (Promega).

Após a irradiação ultravioleta do gel foi possível visualizar o tamanho e intensidade da banda pretendida por comparação com o marcador de peso molecular 100pb (Figura 5), a purificação foi feita através do kit comercial *PCR Clean-Up System* (Promega), que consiste na passagem da amostra por uma coluna de cromatografia, na qual, os ácidos nucleicos juntamente com uma solução *membrane binding* ficam retidos na membrana de sílica, em seguida com uma solução de lavagem, são eliminados os componentes da mistura de PCR. Por fim, o DNA é eluído numa em água livre de nucleases.

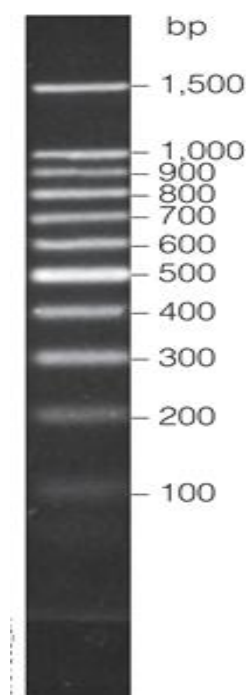


Figura 5. Marcador de peso molecular (Promega) com a indicação dos tamanhos (pb).

3.3.5 - Ligação da ORF do gene *gip* no vector pGEM®-T Easy e transformação de células competentes de *E. coli*

Após a amplificação e purificação do fragmento correspondente à ORF do gene *gip* procedeu-se à clonagem no vector pGEM®-T Easy. A reacção de ligação foi realizada para um volume total de 10 µl numa relação de 50 ng de vector para 50 ng de ORF do gene *gip*, 1 U/µl enzima T4 DNA ligase num tampão de reacção 1X (Promega) e decorreu durante 3 horas a 25 °C. Após a ligação procedeu-se à transformação de 50 µl de células competentes da estirpe DH5α com o total do volume da reacção de ligação. A mistura foi colocada em gelo durante 20 minutos, seguindo-se o choque térmico a 42 °C, em banho-maria durante 45 segundos. As bactérias foram transferidas para gelo durante 2 minutos e incubadas em 1 ml de meio LB sem antibiótico, durante 1 hora e meia a 37 °C com uma agitação superior a 150 rpm, seguidamente foram espalhadas em placas de Petri de LB-agar, com 100 µg/ml ampicilina, 100 mM IPTG e 80 µg/ml X-Gal. As colónias brancas foram repicadas para meio LB liquido com ampicilina 100 µg/ml, seguindo-se uma incubação a 37 °C, durante a 16 horas com agitação superior a 150 rpm.

3.3.6 - Extracção e quantificação do DNA plasmídico

Para a extracção de DNA plasmídico recorreu-se ao método descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), que consiste na concentração das bactérias por centrifugação e ressuspensão numa solução PI (50 mM glucose, 20 mM Tris-HCL pH 8.0 e 10 mM EDTA), seguido de uma incubação com uma solução de lise PII (0.2 N NaOH e 1 % (p/v) SDS) até a solução ficar translúcida. Em seguida adicionou-se uma solução de neutralização de lise PIII (acetato de potássio 5 M, e ácido acético glacial 3 M), após centrifugação recolheu-se o sobrenadante num tubo contendo 1 volume de isopropanol 100 % (v/v) a -20 °C. Por fim procedeu-se à lavagem do sedimento em etanol a 75 % (v/v) e à secagem a 37 °C. O DNA extraído foi diluído em 20 µl de água ultra pura e quantificado de acordo com o ponto 3.3.2.

3.3.7 - Análise dos recombinantes no vector pGEM[®]-T Easy por digestão enzimática para posterior clonagem no vector pET-28a (+)

Após a quantificação, o DNA plasmídico 1 µg/µl foi digerido num tampão de reacção 1X com 10U/µl de *Sac I* e *Hind III* durante 3 horas a 37 °C para um volume de 30 µl. Deste modo, foi possível verificar qual o clone que continha a ORF do gene *gip* pela visualização em gel de agarose 0.8 % (p/v) de duas bandas, uma corresponde ao tamanho do vector pGEM[®]-T Easy e outra correspondente á ORF do gene *gip* por comparação com o marcador 1kb (Figura 6).

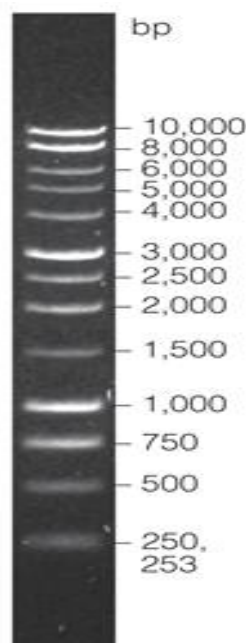


Figura 6. Marcador de peso molecular (Promega) com a indicação dos tamanhos (pb).

3.4 - Clonagem do fragmento *gip* no vector de expressão pET-28a(+)

Vector de expressão de DNA pET-28a(+)

Para a clonagem do gene *gip*, utilizou-se o vector pET28a(+), de 5369pb figura 7, que permite clonar, expressar e purificar proteínas recombinantes em estirpes de *E. coli* e utiliza factores de transcrição do bacteriófago T7.

É um vector que tem uma configuração His-Tag/thrombin/T7Tag no extremo N-terminal e uma sequência opcional His-Tag no extremo C-terminal. A sequência é numerada por uma convecção pBR322, para que a região da expressão T7 se inverta num mapa circular. É um plasmídeo bacteriano autoreplicativo cuja sequência inclui o gene de resistência à canamicina, e a origem de replicação relaxada *colE1*. Os sítios de restrição estão marcados no mapa circular da figura 7.

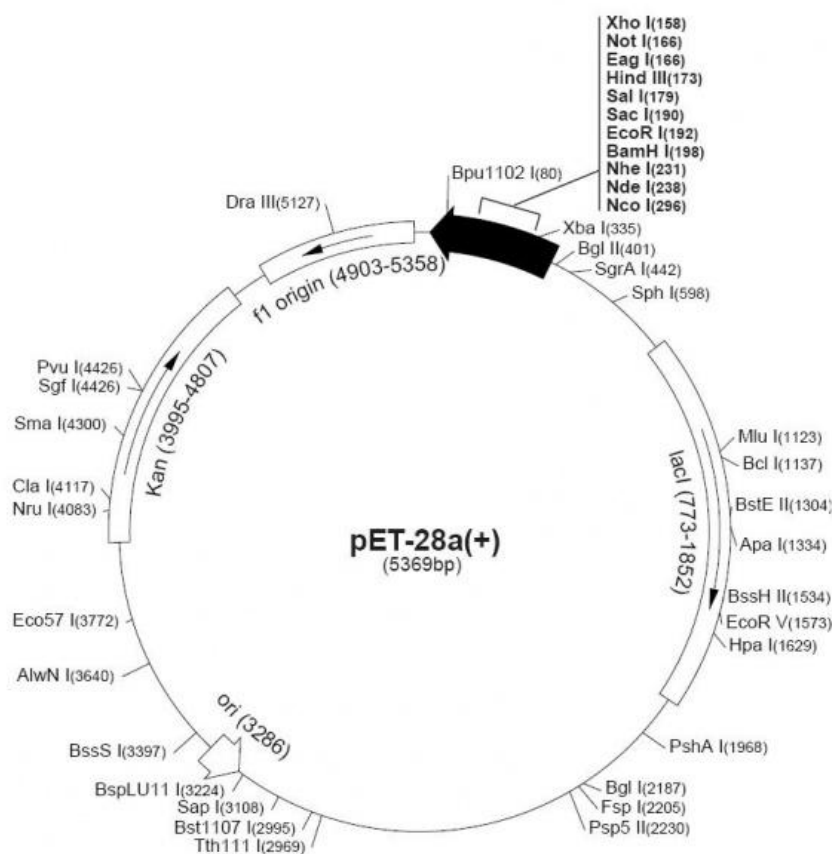


Figura 7. Estrutura do vector de clonagem bacteriana pET-28a(+) com indicação dos sítios de restrição, incluindo os locais de clonagem múltipla.

3.4.1 - Digestão do vector pET-28a(+) e da ORF do gene *gip* com enzimas de restrição

Após a análise dos recombinantes no vector pGEM[®]-T Easy referido no ponto 3.3.7 digeriu-se o vector pET-28a(+). Este foi digerido para um volume de 30 µl num tampão de reacção 1X com 10 U/µl de *Sac I* e 13 U/µl *Hind III* durante 3 horas a 37 °C para um volume de 30 µl. Os fragmentos obtidos foram visualizados, extraídos e purificados através de gel de agarose 0.8 % (p/v) *low melting*.

3.4.2 - Extracção do DNA e purificação por banda em gel de agarose 0.8 % (p/v) *low melting* da ORF do gene *gip* e pET-28a(+)

Os fragmentos de DNA descritos no ponto 3.4.1 foram extraídos e purificados recorrendo ao corte da banda em agarose e o DNA foi purificado com o kit comercial *PCR Clean-Up System*”, como referido no ponto 3.3.4.

3.4.3 - Ligação da ORF do gene *gip* no vector pET-28a(+) e transformação de células competentes de *E. coli*

A reacção de ligação foi realizada para um volume total de 10 µl numa relação de 100 ng de vector para 600 ng de ORF do gene *gip*, 1 U/µl enzima T4 DNA ligase num tampão de reacção 1X e decorreu durante 3 horas a temperatura ambiente (25 °C). A transformação foi realizada por choque térmico de acordo com o ponto (3.3.5) e as bactérias foram plaqueadas em LB-agar com canamicina 30 µg/ml e incubadas durante 16 horas a 37 °C.

3.4.4 - Rastreo das bactérias transformadas com o vector pET28a(+).

As colónias obtidas no ponto anterior foram inoculadas em meio líquido LB com canamicina 30 µg/ml e incubadas durante 16 horas a 37 °C de modo a proceder-se à extracção e quantificação do DNA plasmídico com referido no ponto 3.3.6. A análise do DNA plasmídico dos clones foi efectuada, por digestão enzimática com as respectivas enzimas de restrição *Sac I* e *Hind III*.

As condições em que ocorreu a digestão foram as seguintes: DNA 1µg/µl; Buffer E; *SacI* 10 U/µl; *Hind III* 13 U/µl; num volume final de 20 µl, durante 4 horas a 37 °C. A análise dos produtos da digestão foi efectuada por electroforese em gel de agarose 0.8 % (p/v) em TAE 1X e o DNA foi visualizado com brometo de etídio, numa concentração final de 0.5 µg/µl.

3.5 - Análise da expressão da proteína GIP por SDS-PAGE

3.5.1 - Indução da expressão da proteína GIP

As colónias de *E. coli* transformadas com o vector pET-28a(+), foram inoculadas em meio LB líquido, com canamicina 30 µg/ml a 37 °C sob agitação 180 rpm até atingirem uma absorvância 0.5 a um comprimento de onda de 600 nm. Os pré-inóculos foram então diluídos de 1:50 em LB com canamicina 30 µg/ml e incubados a 37 °C até atingirem uma absorvância de 0.5. A indução da expressão da proteína, foi realizada pela adição de IPTG numa concentração final de 1 mM, após as culturas atingirem a densidade óptica de 0.5. A indução realizou-se de 8 em 8 horas a 37 °C sobre agitação vigorosa 220 rpm, durante 5 tempos de crescimento. As culturas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C onde se procedeu à precipitação das proteínas do sobrenadante e à extracção e precipitação através da lise celular das *E. coli*.

3.5.2 - Preparação de proteínas a partir do meio de cultura

Ao sobrenadante resultante do ponto 3.5.1 foi adicionado TCA (ácido tricloroacético) para uma concentração final de 8 % (v/v), para ocorrer a precipitação das proteínas. A precipitação decorreu durante 10 minutos. Seguidamente procedeu-se à sedimentação do precipitado por centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos.

O sedimento proteico obtido, foi lavado com acetona refrigerada a -20 °C e sedimentado por centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos. Após evaporação da acetona, ressuspenderam-se os sedimentos proteicos numa solução de 1M Tris-HCL pH 6.8.

3.5.3 - Preparação de proteínas a partir de lisados bacterianos

Os sedimentos bacterianos obtidos como se refere no ponto 3.5.1 foram ressuspensos numa solução de lise (50 mM Tris-HCL pH 7.5, 50 mM EDTA e 1 mM PMSF).

As bactérias foram lisadas com agitação no vortex, até que a solução se apresentasse translúcida. Posteriormente, centrifugou-se a solução para sedimentar os detritos celulares, durante 30 minutos a 10000 rpm a uma temperatura de 4 °C. O lisado celular clarificado foi ressuspendido numa solução 1 M Tris-HCL pH 6.8.

3.5.4 - Quantificação da proteína GIP

A quantificação da proteína GIP foi feita recorrendo a *Protein quantification kit-general use* (FluKa) usando o método Bradford. Este método é baseado na interacção entre o corante Coomassie brilliant blue BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reacção, a interacção entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica, que absorve fortemente em 595 nm. A concentração obtida da proteína GIP foi de 0.8 µg/µl.

3.5.5 - Análise da proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A proteína foi analisada em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), constituído por um gel de concentração com 4 % (p/v) de acrilamida e um gel de resolução com 15 % de acrilamida (p/v).

Inicialmente preparou-se o gel de resolução constituído por acrilamida 15 %, Tris-HCl 1.5 M para uma concentração final de 25 % (v/v), SDS 10 % para uma concentração final de 1 % (v/v). Para a polimerização do gel foi adicionado APS 10 % (persulfato de amónia) para uma concentração final de 0.05 % (v/v) e TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina) 0.05 % (v/v).

O gel de resolução foi vertido entre duas placas de vidro (componentes do aparelho de separação electroforética utilizando Mini Protean 3, Biorad) e sobreposto por um pequeno volume de isopropanol até polimerizar. Verteu-se de seguida o gel de concentração, preparado como descrito acima para o gel de resolução mas, substituindo a solução Tris HCl 1.5 M por Tris 0.5 M e utilizando o dobro da quantidade de TEMED. De seguida colocou-se um pente apropriado para a formação de poços no gel para a aplicação das amostras.

Antes de serem colocados no gel, as amostras foram misturadas com tampão de amostra (SDS a 4 % (p/v), glicerol a 50 % (v/v), Tris HCL a 0.25 M, azul de bromofenol a 0.005 % (p/v) e B-Mercaptoetanol a 10 % (v/v), seguindo-se de desnaturação durante 4 minutos a 95 °C.

Paralelamente às amostras foi corrido um marcador de pesos moleculares conhecidos de proteínas ("Molecular Weight Standards", Broad Range- Biorad).

A electroforese decorreu sob uma diferença de potencial de 100 V durante 90 minutos em tampão de electroforese (Tris base 25 mM, SDS a 0.1 % (p/v) e glicina 192 mM e SDS a 0.1 % (p/v)).

3.5.6 - Detecção não específica de proteínas por coloração com o azul brilhante de Coomassie

Recorreu-se à coloração de azul brilhante de Coomassie, composta por azul brilhante de Coomassie, a 0.25 % (p/v) (Biorad), metanol a 45 % (v/v) e ácido acético a 10 % (v/v), onde o gel ficou submerso, à temperatura ambiente (25 °C) com agitação suave, durante 30 minutos.

Ao fim desse tempo procedeu-se à remoção do corante utilizando uma solução composta por metanol a 45 % (v/v), ácido acético a 10 % (v/v), que foi substituída em intervalos de 60 minutos até se obter um contraste que permitiu a visualização e distinção das bandas no gel.

3.6 - Crescimento de *Phytophthora cinnamomi* em meios de cultura com diferentes substratos indutores

A indução da expressão do mRNA do gene *gip*, foi realizada recorrendo a diferentes substratos de indução: glucose 2.0 % (p/v), celulose 0.2 % (p/v) e serrim 0.2 % (p/v). *P. cinnamomi* foi previamente crescida durante 6 dias a 25 °C em placas de Petri com meio mínimo rico em glucose 2.0 % (p/v) coberto com uma membrana de celofane, sendo depois, transferidas partes iguais do micélio para *erlenmeyers* com 150 ml de meio indutor e colocados a 25 °C e a uma agitação de 100 rpm.

Procedeu-se a uma centrifugação a 14000 rpm para remoção do excesso do meio líquido e recolha do micélio.

3.6.1 - Extração e análise de RNA de *Phytophthora cinnamomi* crescido em meios com diferentes substratos indutores.

Os micélios de *P. cinnamomi* foram recolhidos e extraídos aos 2, 4, 6 e 8 dias de crescimento, sendo macerados com azoto líquido (-70 °C) e transferidos para tubos de

1,5 ml para se proceder à extracção de RNA com o kit comercial RNeasy[®] Plant Mini Kit (Quiagen).

A extracção do RNA consistiu na lise celular através da adição de uma solução RLC com β -Mercaptoetanol e uma incubação a 56 °C durante 5 minutos e à passagem da amostra por uma coluna de *QIAshredder spin*, na qual, os detritos celulares e o DNA ficam retidos na membrana. O sobrenadante recolhido foi precipitado em 0.5 volume de etanol a 100 % (v/v) e centrifugado a 10000 rpm durante 1 minuto numa coluna de *RNeasy spin* na qual o RNA fica retido na membrana, seguindo-se as lavagens com uma solução RW1, sendo o etanol e os componentes da mistura do sobrenadante eliminados da coluna e através de uma solução RPE. Por fim, o RNA é eluído numa solução de água livre de RNases.

O RNA foi tratado com uma solução de Dnase I, de modo a eliminar as contaminações com o DNA genómico proveniente da extracção. A integridade do RNA foi avaliada por electroforese em gel de agarose 1.5 % (p/v) desnaturante. De forma a diminuir a contaminação com RNases das soluções, equipamentos, e reagentes, foram tratados com água com DEPC seguidos de autoclavagem a 121 °C.

3.6.2 - Quantificação do RNA de *Phytophthora cinnamomi*

A quantificação do RNA total foi feita recorrendo ao doseamento por espectrofotometria. A concentração das amostras de RNA foi calculada através da formula:

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260} \times Fc \times fd}{1000}$$

Onde $A_{260\text{nm}}$ é valor de leitura da amostra a 260 nm; Fc corresponde ao factor de conversão, no qual a $A_{260\text{nm}}$ máxima é 1 e corresponde a 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de RNA; fd corresponde ao factor de diluição da amostra de leitura, sendo o resultado da multiplicação, dividido por mil para obtermos a concentração em $\mu\text{g }\mu\text{l}^{-1}$. As leituras das densidades ópticas foram efectuadas a 2 comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm, num espectrofotómetro Genesys 10UV (Thermo electron corporation). O grau de pureza do RNA foi calculado através da razão entre os valores de absorvência (A_{260}/A_{280}).

Para que um RNA seja considerado puro é necessário que esta razão esteja compreendida entre 1.6 e 1.8. Uma razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ inferior a 1.65 indica que a amostra de RNA está contaminada com proteínas, por outro lado se essa razão for

superior a 1.8 existe uma contaminação com sais e/ou reagentes utilizados durante a extracção. Após a obtenção das leituras espectrofotométricas, fizeram-se as respectivas diluições das várias amostras de RNA, de modo a obter uma concentração final de RNA de 2 µg/µl.

3.6.3 - RT-qPCR

A RT-qPCR é uma técnica que permite detectar e quantificar a expressão de genes em pequenas quantidades de amostra. Esta vantagem torna-se importante porque durante as primeiras fases de infecção a biomassa do patógeno no hospedeiro encontra-se em quantidades mínimas e dificulta a detecção por métodos padronizados, nomeadamente o Northern blot (Freeman *et al.*, 1999).

3.6.4 - Síntese de cDNA de *Phytophthora cinnamomi*

A conversão do RNA em cDNA foi obtido a partir de transcrição reversa que usa como molde o mRNA, ou seja, o RNA já processado que não apresenta intrões, recorrendo a *primers* do tipo oligo d(T) que hibridam nas caudas poli(A) do RNA mensageiro e os *primers random* que hibridam aleatoriamente e permitem a conversão do RNA total. As reacções foram preparadas com o kit comercial iScript™ cDNA *Synthesis kit* (BioRad) para um volume total de 20 µl. Em cada reacção utilizou-se igual concentração de RNA (ponto 3.6.2) A síntese de cDNA decorreu a 42 °C durante 30 minutos.

3.6.5 - qPCR na análise de expressão do gene *gip* de *Phytophthora cinnamomi*

Para a análise da expressão do gene *gip*, foi utilizado como controlo interno, o gene *actina2* (*GenBank*:AM412176) pois é um gene *housekeeping* ou gene constitutivo: 1) uma vez que é expresso em todo o tipo de células, porque é necessário para as funções básicas de sobrevivência celular, 2) estar disponível no *GenBank* para estudo com *Phytophthora cinnamomi* e 3) possuir uma homologia aproximadamente de 100 % com as sequências das ORF das actinas de *Phytophthora*.

A amplificação deste gene, garante poder quantificar o nível de expressão do gene *gip* em todas as amostras estudadas. As amostras de cDNA foram amplificadas por PCR num volume final de 25 µl recorrendo ao kit comercial IQTM SYBR[®] *Green Supermix* (Biorad). Em cada reacção utilizaram-se três triplicados décimas (diluições de 1:1; 1:10; 1:100) partindo de um volume de 2 µl da solução de cDNA e 12.5 µl de IQ SYBR *Green Supermix* e 1.25 pmol/µl de cada *primer*. As condições físicas usadas na reacção de amplificação foram as descritas na tabela 2 (Anexo II).

Os *primers* referenciados na tabela 3 foram desenhados com base nas sequências disponíveis no *GenBank* código de acesso AM412176 e AM259384, recorrendo ao programa *Primer 3* tendo em conta o tamanho recomendado (150pb-200pb) para a técnica segundo as normas internacionais.

A análise da expressão do gene *gip* foi feita recorrendo ao método *SyBr green* e a reacção de quantificação foi realizada no aparelho *MiniOpticonTM Real-Time PCR Detection System* (Biorad).

Tabela 3. *Primers* utilizados no qPCR. Na coluna da esquerda está representado o gene para o qual se efectuou qPCR ao qual correspondem os respectivos *primers forward*, *reverse*. Todos os *primers* estão descritos na orientação 5´-3´.

<i>act2</i>	<i>Forward</i>	GGCCTCGAGAAGAGCTACG
	<i>Reverse:</i>	CTTCATGATGGTCTGGAACG
<i>gip</i>	<i>Forward</i>	TGGTGGTGCTCTCATCAGTC
	<i>Reverse:</i>	GCGAACTTGCTTGGATTCTC

3.7 - Óleos essenciais de *Mentha pulegium* L em biotestes com plantas de *Castanea sativa* Mill e com *Phytophthora cinnamomi*

3.7.1 - *Mentha pulegium* L.

A espécie vegetal utilizada nos biotestes com *Phytophthora cinnamomi* e *Castanea sativa* Mill foi a *Mentha pulegium* L, vulgarmente designada por poejo, recolhida na região de Bragança no Nordeste Transmontano, tem preferência por locais húmidos ou inundados no inverno, cresce nas margens de riachos e outros cursos de água ou em valas. Esta é uma planta silvestre espontânea nesta área onde encontra boas condições edafoclimáticas para o seu desenvolvimento.

A *Mentha pulegium* pertence à família das Lamiaceae e ao género *Mentha*. É uma planta com utilizações em áreas variadas, como a medicina, alimentação e indústria, fundamentalmente pela produção de um óleo essencial de aroma característico. A recolha da planta foi feita durante os meses de Julho e Agosto em plena floração e durante as horas do início do dia, numa zona de lameiro junto a um curso de água, e as plantas foram recolhidas aleatoriamente de modo a recolhermos uma amostra alargada da população.

3.7.2 - Plantas micropropagadas de castanheiro *Castanea sativa* Mill

A avaliação do crescimento de *Castanea sativa* Mill na presença de óleos essenciais de *Mentha pulegium* foi feita recorrendo a plantas micropropagadas.

A micropropagação de clones adultos de plantas de castanheiro foi realizada segundo o método descrito por Feijó (1989); e adaptado por Martins (1997). O método consiste na inoculação dos gomos axilares, multiplicação de meristemas por rebentamento axilar, e alongamento dos rebentos.

As plantas micropropagadas foram inoculadas em frasco com meio MS (Murashige, Skoong) modificado com 0,1 mg/l de AIB 30 gramas por litro de sacarose.

No processo de micropropagação, todas as manipulações em esterilidade foram efectuadas em câmara de fluxo laminar horizontal (Heraeus *guard*).

A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave (P. SELECTA® Heraeus) a 121 °C e 1 atm e a de instrumentos de dissecação e acessórios para cultura, em estufa de esterilização (Heraeus) a 150 °C durante 2 horas.

3.7.3 - Extração de óleos de *Mentha pulegium* e identificação dos compostos por cromatografia gasosa (GC)

Os óleos essenciais extraídos de *Mentha pulegium* L foram obtidos por hidrodestilação usando um aparelho de Clevenger. A extração foi realizada durante três horas em 500 ml de água ultrapura. Quando o vapor proveniente do balão sobe, arrastando pequenas gotas de óleo, essas gotas seguem juntamente com o vapor de água até um condensador onde são condensadas e finalmente recolhidas.

Foi determinado o peso fresco do material antes da destilação e com base no volume final de óleo obtido foi calculado o rendimento por peso fresco. Posteriormente o óleo obtido foi armazenado a -20 °C em frascos de vidro de 1,5 ml.

Recorrendo a cromatografia gasosa as amostras foram identificadas quimicamente nos seus componentes majoritários.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem gás XL (Perkin Elmer, Shelton, CT), equipado com dois detectores de ionização de chama (FID), um sistema de manipulação de dados, um injetor de vaporização e duas colunas de sílica fundida de diferentes polaridades; uma coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm de diâmetro, espessura do filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc., Rancho Cordova, CA, EUA) e outra DB-17HT (30 m x 0,25 mm, diâmetro e 0,15 µm de espessura; J & W Scientific Inc).

A temperatura do forno foi programada para 45-175 °C, a 3 °C/min e posteriormente a 15 °C /min até 300 °C, mantidos isotérmica durante 10 min, o injetor e detector de temperatura, 280 °C e 300 °C, respectivamente, gás de arraste hidrogénio, ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s.

3.7.4 - Avaliação do crescimento de plantas de *Castanea sativa* Mill na presença de óleos essenciais de *Mentha pulegium*

O crescimento de plantas de castanheiro “*in vitro*” foi avaliado, na presença de círculos de papel de filtro humedecido em óleos essenciais em diferentes concentrações, de 2 % (v/v), 10 % (v/v), 50 % (v/v) bem como 80 % (v/v) 90 % (v/v) e 100 % (v/v) as diluições foram feitas com álcool 70 % (v/v). O controlo foi feito com álcool a 70 % (v/v).

O crescimento foi avaliado durante 4 semanas. O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoong 1962) modificado meio com 0,1 mg/l de AIB e 30 gramas de sacarose por litro.

As plantas foram mantidas em todas as fases de micropropagação, em câmara de cultura com fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de escuridão e temperatura respectiva de 25 °C e 18 °C. A intensidade luminosa 2000 lux foi mantida constante (Martins, 1997).

3.7.5 - Avaliação do crescimento de *Phytophthora cinnamomi* na presença de óleos essenciais de *Mentha pulegium*

Procedeu-se de igual forma, avaliando o crescimento do microrganismo *P. cinnamomi* em placas com meio de cultura, PDA na presença de círculos de papel de filtro humedecido em óleos essenciais, nas concentrações já referidas em 3.7.4 durante 4 semanas. As mesmas condições foram testadas para meio líquido, PDB-Potato Dextrose Broth (DifcoTM).

4 - Resultados e Discussão

Numa primeira etapa deste trabalho procedeu-se, a extracção de DNA genómico de *P. cinnamomi* (Figura 8.A) e respectiva amplificação da ORF do gene *gip* (Figura 8.B) seguindo-se a purificação do produto de PCR e posterior clonagem no vector de replicação pGEM[®]-T Easy.

Como é possível visualizar na figura 8 a extracção de DNA genómico, e a amplificação do gene, foram realizadas com sucesso, permitindo passar a etapa seguinte.

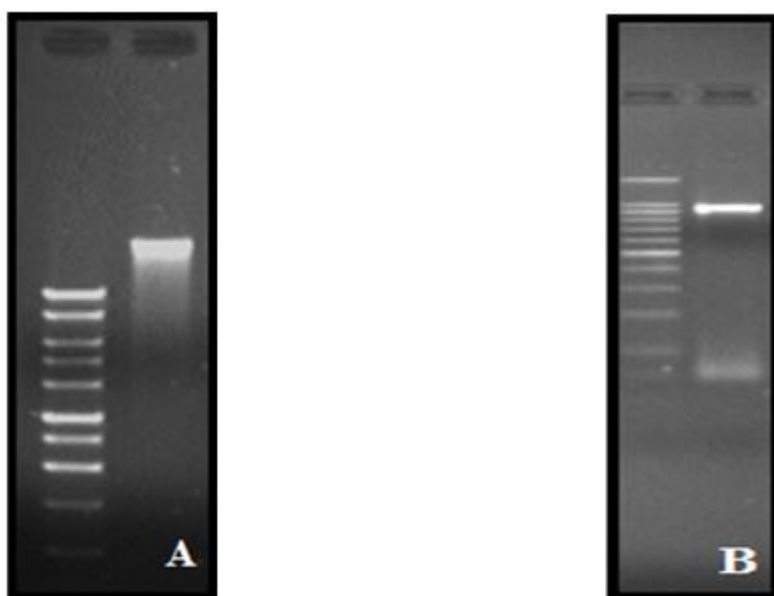


Figura 8. (A) Extracção de DNA genómico de *Phytophthora cinnamomi* e o marcador de 1Kb.
(B) Amplificação de um produto de PCR de 940pb correspondente à ORF do gene *gip* e respectivo marcador.

Após a clonagem no vector pGEM[®]-T Easy, que teve como objectivo principal obter uma maior quantidade de DNA da ORF do gene *gip* e facilitar a sua ligação no vector pET-28a(+).

O produto resultante da digestão enzimática, foi separado por electroforese em gel de agarose 0.8 % (p/v), sendo possível visualizar uma banda de 3015pb correspondente ao vector pGEM[®]-T Easy e outra de 940pb correspondente à ORF do gene *gip*, quando

comparado com o marcador de peso molecular 1Kb. Na figura 9 encontra-se representado o resultado da digestão enzimática, indicado com o numero 1 o vector pGEM[®]-T Easy, e a ORF do gene *gip* com o número 2.

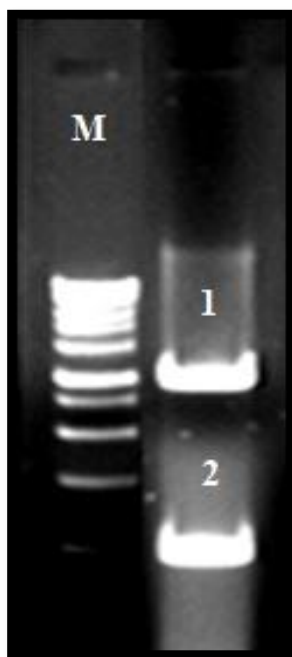


Figura 9. Digestão do clone pGEM[®]-T Easy/*gip* com as enzimas *Sac I* e *Hind III* e o respectivo marcador de 1Kb.

Segue-se a clonagem do fragmento *gip* no vector pET-28a(+), sendo posteriormente feito o rastreio dos plasmídios recombinantes obtidos e visualizados em gel de agarose 0.8 % (v/v).

Na figura 10 encontra-se o resultado da extracção dos plasmídios recombinantes, sendo possível a observação de bandas com diferentes tamanhos comparativamente com o marcador de peso molecular e com o vector pET-28a(+) de 5369pb.

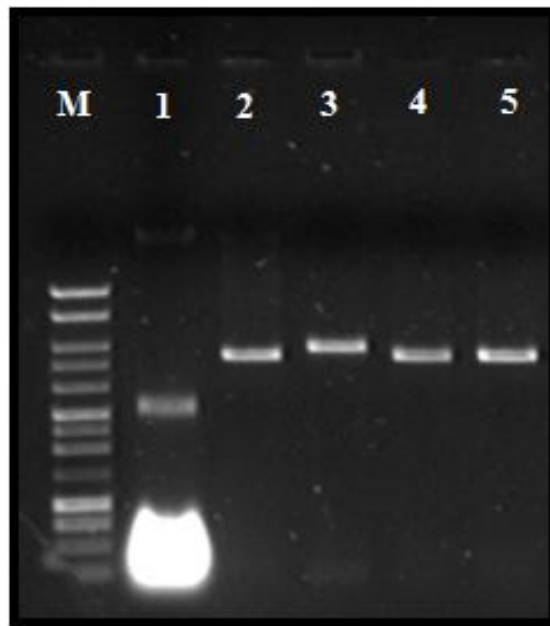


Figura 10. Extração de plasmídios recombinantes. **(M)** Marcador de peso molecular (10000pb); **(1)** Vector pET-28a(+). **(2, 3, 4, 5)** Plasmídios recombinantes.

Após identificado do clone que continha a ORF do gene *gip* (Figura 10, (3)) foi necessário verificar a sua orientação, deste modo foram realizadas digestões enzimática de forma a libertar o fragmento de interesse inserido no plasmídio.

O DNA plasmídico foi digerido com as enzimas *Sac I* e *Hind III* obtendo-se uma banda com um tamanho de 940pb correspondente a ORF do gene *gip* e outra banda de 5369pb correspondente ao vector pET-28a(+), foram ainda efectuadas digestões prova em outros recombinantes, (Figura 10, (2, 3, 4)) usando a enzima *Xho I*, no entanto não se obtiveram clones com o gene de interesse (Figura 11).

A análise foi feita por electroforese em gel de agarose 0.8 % (p/v) e as suas dimensões confirmadas por comparação com um marcador de peso molecular (Figura 11).

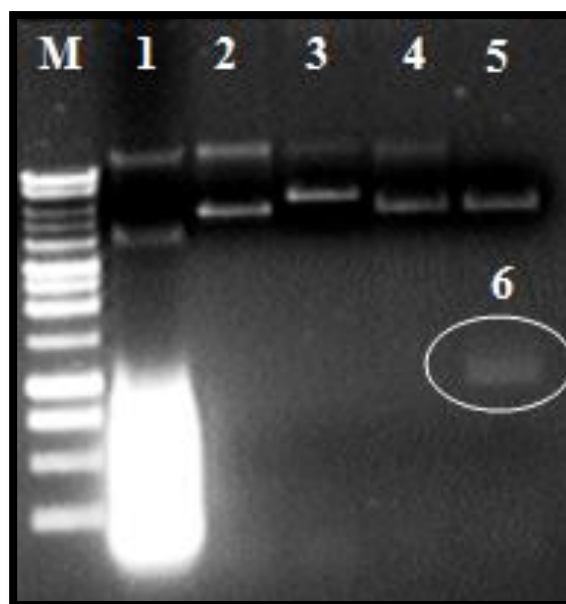


Figura 11. Digestão enzimática dos plasmídios recombinantes. **(M)** marcador de peso molecular 1Kb; **(1)** Plasmídio pET-28a(+) sem digerir. **(2, 3, 4)** Digestão prova feitas com a enzima *Xho I*. **(5)** Plasmídio pET-28a(+) digerido. **(6)** Fragmento do gene *gip* libertado por digestão enzimática.

Ao clone obtido foi dado o nome de pETgip (que representa a ORF do gene *gip* e clonado no pET-28a(+) em *E. coli* DH5 α).

O recurso ao sistema de expressão pET-28a(+) permitiu a clonagem do gene *gip* e desta forma efectuar o seu estudo isoladamente num organismo independente, *E.coli*. Assim cedo, procedeu-se a realização dos crescimentos do clone pETgip em meios com indutor e sem indutor, permitindo fazer uma avaliação da expressão da proteína.

A indução da expressão da proteína, foi realizada pela adição de IPTG 1 mM e a precipitação foi feita por TCA 8 % (v/v). Após a quantificação da proteína, as amostras recolhidas para os diferentes tempos foram carregadas no gel de poliacrilamida SDS-PAGE e terminada a corrida, o gel foi corado e descorado a fim de ser possível visualizar o perfil de bandas das diferentes amostras.

A observação do gel indica que a banda correspondente à proteína GIP de 31kD poderá localiza-se no gel comparativamente com o marcador de proteínas *Precision Plus Protein* (Biorad) (Figura 12), entre a banda de 25 kD e 37 kD respectivamente.

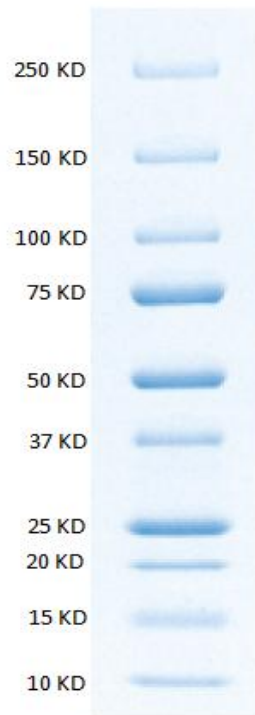


Figura 12. Marcador de proteínas com a indicação dos tamanhos de cada banda (kD).

A observação detalhada do gel indica que a proteína não é expressa num meio sem indução e que no meio com indução, apresenta alguma expressão ao fim de 8 horas de crescimento, (Figura 13, (2)).

De acordo com a curva de crescimento da *E. coli*, a expressão ocorre na fase exponencial, não se verificando expressão nas restantes fases.

Os resultados revelam que a proteína expressa é encontrada no sobrenadante, ou seja é secretada para o meio de cultura.

Nas amostras correspondentes aos sedimentos proteicos do interior da célula, não se verificou expressão.

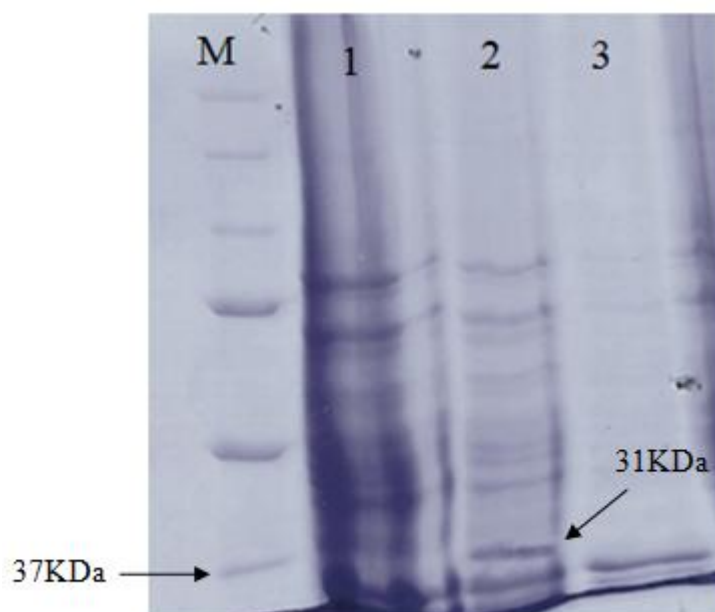


Figura 13. Visualização da expressão de proteína. em gel poliacrilamida/SDS (15 %). **(M)** Marcador, **(1)** *E. coli* sem indução. **(2)** Clone pETgip com indução. **(3)** Clone pETgip sem indução.

Neste trabalho para além de se efectuar a clonagem num sistema de expressão independente, procedeu-se a análise da expressão e quantificação do gene *gip* recorrendo a técnica RT-qPCR, partindo de RNA extraído de *P. cinnamomi* crescida em meios com substratos indutores e em diferentes tempos de crescimento 2, 4, 6, 8 dias.

Com objectivo de aproximar as condições utilizadas com a realidade do organismo, recorreu-se aos substratos; celulose, glucose e serrim. Considerando o sistema planta-patogénio e uma vez que na natureza o patogénio se encontra no solo, tendo como substratos naturais alguns destes compostos.

A figura 14 representa uma extracção de RNA do patogénio *P. cinnamomi* crescida nos meios indutores.

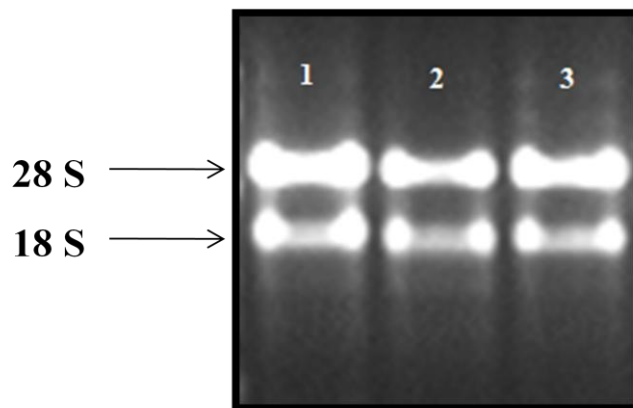


Figura 14. RNA de *Phytophthora cinnamomi* ao fim de 8 dias de crescimento em meio de cultura com substratos indutores (1) glucose 2.0 % (v/v); (2) celulose 0.2 % (v/v) e (3) serrim 0.2 % (v/v).

Após a conversão do RNA em cDNA, obtido a partir da transcrição reversa, procedeu-se a análise da expressão do gene *gip* por qPCR.

A avaliação da eficiência de amplificação por PCR foi realizada a partir de diluições sequenciais de cDNA de modo a estabelecer uma relação linear entre o ciclo em que a fluorescência foi detectada durante a fase exponencial (C_t) e o \log da concentração de cDNA. Conforme a concentração do cDNA diminui, aumenta o número de ciclos necessários para a detecção da fluorescência (C_t).

Por meio do valor da inclinação (*slope*) da curva, foi calculada a eficiência da amplificação pela fórmula:

$$E (\text{eficiência de amplificação}) = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Para a normalização das amostras foi utilizado como controlo endógeno (CE), a *act2* e os resultados foram normalizados através da razão entre o valor do C_t obtido para o gene da *act2*, e o valor C_t obtido para o gene *gip*. A equação utilizada para a normalização foi:

$$C_t = C_t (\text{gene } gip) - C_t (\text{controlo } act2)$$

O aumento da concentração de cDNA para cada condição foi calculado por meio da fórmula:

$$Ct = Ct \text{ amostra} - Ct \text{ do calibrador}$$

O calibrador é o valor do Ct obtido para uma amostra específica e o aumento do nível de expressão é obtido em relação ao calibrador específico utilizado.

Devido ao facto de os genes *gip* e *act2*, apresentarem uma eficiência aproximadamente de 100 % com (~5 %) de erro (Figura 15), foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, “Método de Livak” para análise relativa da expressão do gene.

Para todas as reacções de qPCR foi feita a curva de dissociação para a verificação de amplificações inespecíficas, que podem ocorrer devido a contaminações, sendo possível verificar que não ocorreram contaminações durante o processo, (Figura 16).

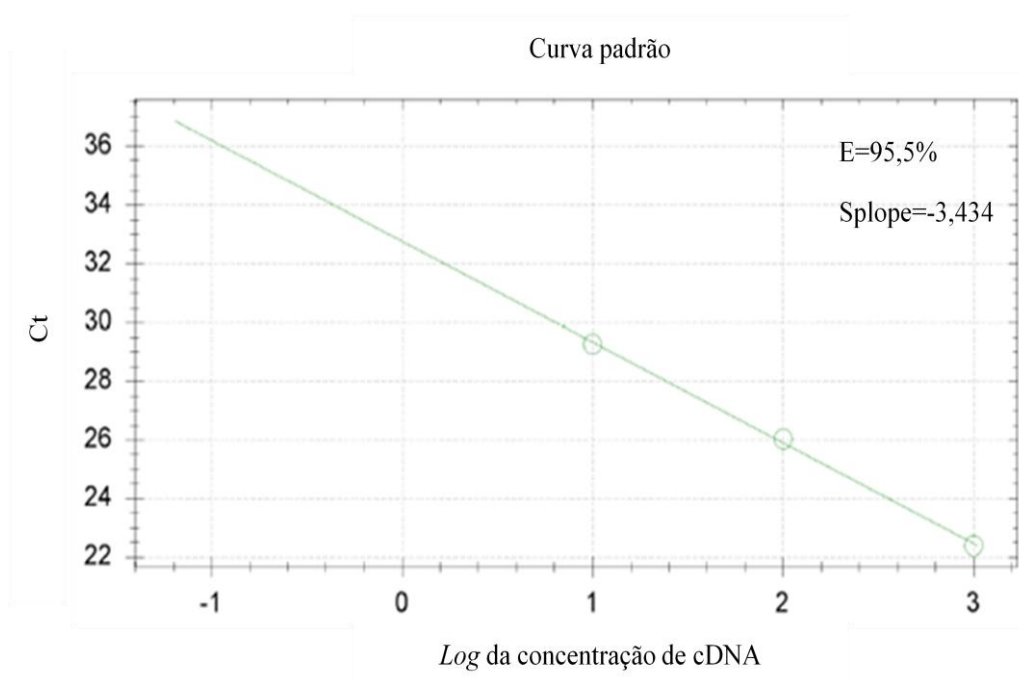


Figura 15. - Curva padrão baseada nas diluições de DNA

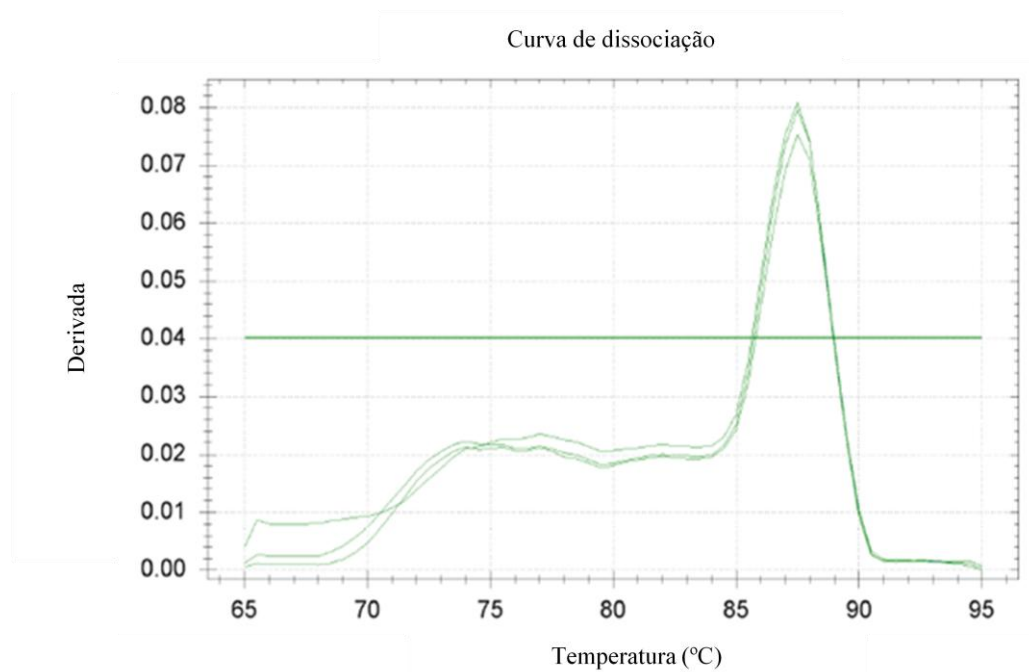


Figura 16. Curva de dissociação realizada para verificar a existência de contaminantes.

A análise feita por RT-qPCR revelou que ocorreu expressão em todos os meios de cultura, no entanto destaca-se maior expressão na presença do serrim como substrato indutor. Como se pode observar na figura 17, ao fim de oito dias de crescimento micelial o patógeno na presença de serrim 0.2 % (v/v) expressa maior quantidade de gene *gip* o que induz a expressão da proteína inibidora de glucanases (GIP).

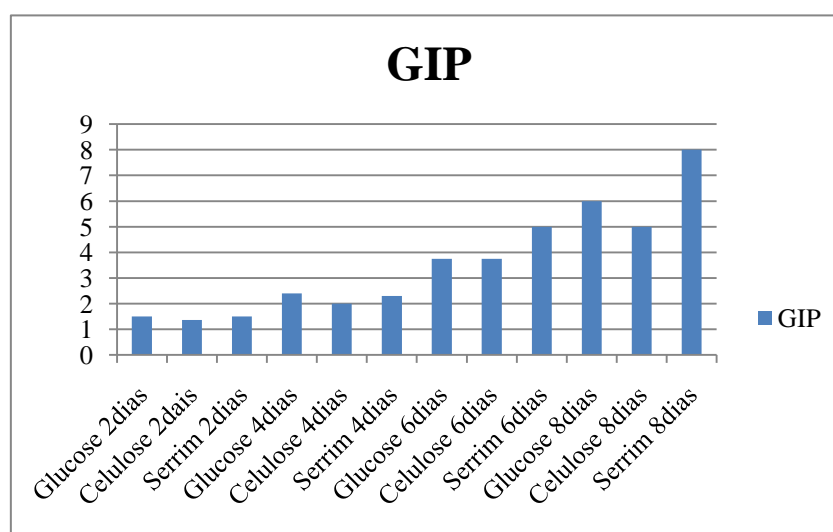


Figura 17. Quantificação relativa do gene *gip* por qPCR, em glucose 2.0 % (v/v); celulose 0.2 % (v/v); serrim 0.2 % (v/v).

A expressão do gene aumentou ao longo do tempo de crescimento, apresentando um máximo ao 8º dia. Este facto poderá estar relacionado com a adaptação por parte do organismo ao meio de cultura, expressando maior quantidade nos últimos 6 e 8 dias.

A glucose e a celulose, são fontes de carbono mais simples quando comparadas com o serrim, facilmente degradáveis pelo patógeno, no entanto é com o serrim que ocorre maior expressão (Figura 18). O serrim “extracto de madeira de castanheiro” é considerado neste trabalho como sendo o composto que mais similaridade tem com o substrato natural usado pelo patógeno, poderá dizer-se que a expressão da proteína pode estar relacionada com este facto.

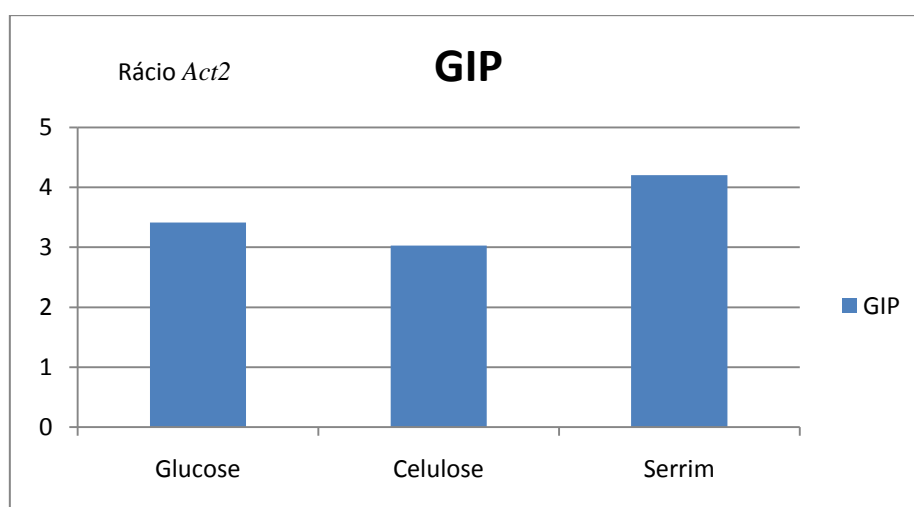


Figura 18. Substratos indutores e expressão do gene *gip*.

Paralelamente, procedeu-se à extracção de óleos essenciais de *Mentha pulegium* L a fim de serem testados no controlo do patógeno.

Mentha pulegium L é uma planta silvestre que cresce espontaneamente em grande quantidade na região do Nordeste de Portugal, sendo fácil de identificar e é usada neste trabalho com o objectivo de avaliar a sua capacidade antimicrobiana no controlo de *P. cinnamomi*.

Inicialmente procedeu-se a extracção de óleos essenciais de *Mentha pulegium*, por hidrodestilação, e posterior identificação química nos seus componentes majoritários por cromatografia gasosa GC, sendo a composição percentual dos óleos calculada pelo método de normalização das áreas dos picos, fazendo uma média de duas injecções por

cada extracção. A tabela 4 caracteriza os compostos que foram identificados por CG na extracção de óleos essenciais de *Mentha pulegium* da região de Bragança.

Tabela 4. Composição percentual dos compostos identificados por cromatografia gasosa (GC).

Compostos	% (v/v) de Compostos
Mentone	5.2
Pulegone	73.2
Piperitone	15.6
Total	94.0

A identificação de compostos maioritários por GC, revelou a presença de monoterenos como a Mentone, Pulegone e Piperitone. Verificou-se que o composto maioritário é o pulegone 73.2 %, seguindo-se a piperitone com 15.6 % e com menor quantidade a mentone com 5.2 %.

São essencialmente monoterpenos e uma cetona (piperitone), sendo o composto maioritário também comum a outras mentas e mesmo a plantas de outros géneros, estando descrita como tóxica em grandes quantidades para animais e insectos.

A Mentone é um monoterpeno e uma cetona, é estruturalmente relacionado com o mentol que tem um derivado do álcool no lugar do carbonil, na maioria dos óleos essenciais, é um composto de menor importância.

Há no entanto que realçar que esta análise foi feita só com GC e portanto os componentes do óleo com menor concentração (componente minoritários) não podem ser identificados com esta técnica, o que poderá escamotear informação nomeadamente componentes que embora em menor concentração sejam os maiores contribuintes para os efeitos biológicos deste óleo.

Seria pois importante fazer análise por GC-MS para então ter o perfil completo do óleo, uma vez que neste trabalho não foi possível chegar a esse ponto.

Relativamente à determinação da concentração mínima de bioactividade, num primeiro ensaio foram efectuados crescimento do patogenio em placa na presença de rodela de filtro embebidas em diferentes concentrações de óleos essenciais, 2 % (v/v), 10 % (v/v) e 50 % (v/v), o controlo decorreu em etanol a 70 % (Figura 19).

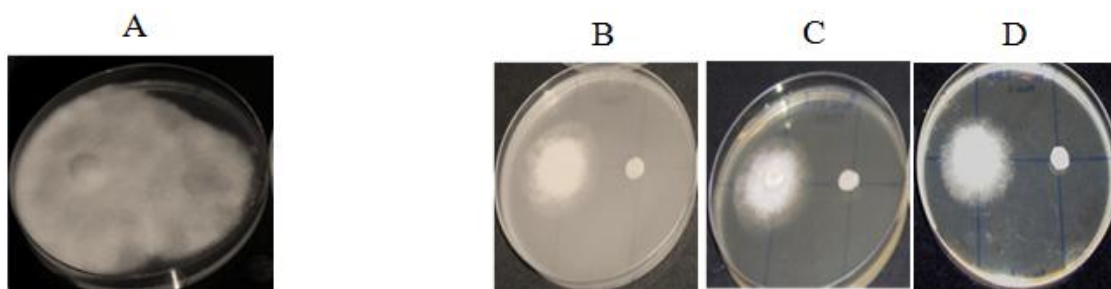


Figura 19. Crescimento em placa de *Phytophthora cinnamomi* na presença de óleos essenciais de *Mentha pulegium* durante 4 semanas, **(A)** Controlo, **(B)** 10 % (v/v) em óleos; **(C)** 20 % (v/v) em óleos; **(D)** 50 % (v/v) em óleos.

Neste ensaio, não ocorreu inibição do crescimento de *P. cinnamomi* na presença de óleos essenciais para concentrações entre 2-50 % (v/v), (Figura 20).

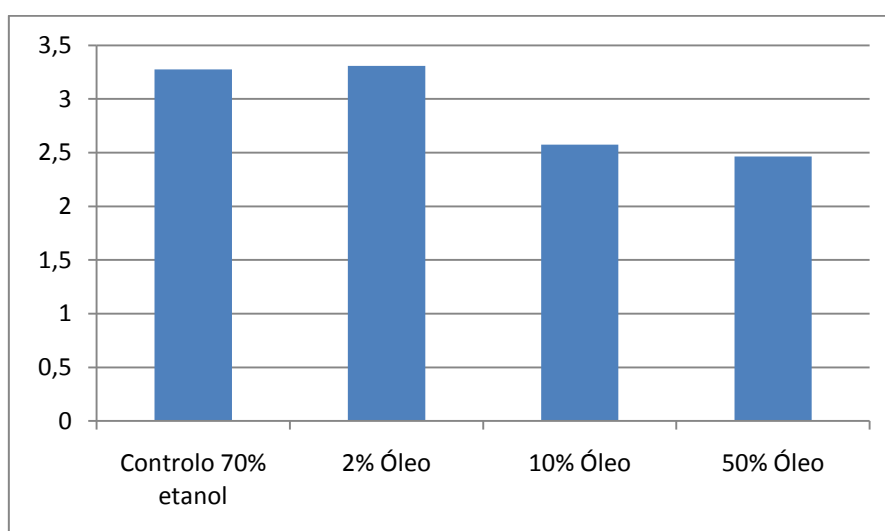


Figura 20. Crescimento de *Phytophthora cinnamomi* na presença de óleos essenciais de *Mentha pulegium*.

Procedeu-se a realização ensaios para testar concentrações mais altas 80 % (v/v), 90 % (v/v), e 100 % (v/v), em óleos essenciais.

Os dados obtidos revelaram que o patogenio é inibido apartir de 80 % (v/v) como se pode vizualizar na figura 21, ocorreu inibição completa.

Nas mesmas condições foram efectuados ensaios em meio líquido PDB-Potato Dextrose Broth, (Difco TM), sendo obtido o mesmo resultado.

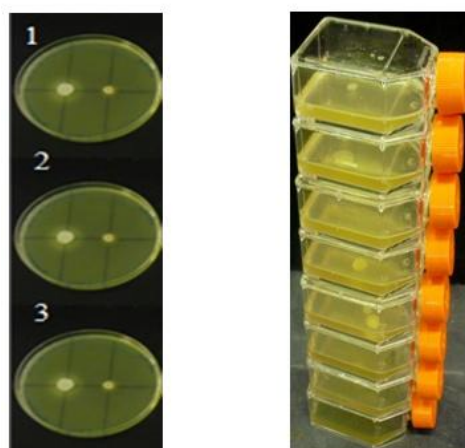


Figura 21. (A) Crescimento de *Phytophthora cinnamomi* na presença de óleos essencial de *Mentha pulegium*, em meio PDA, (1) 100 % (v/v) em óleos; (2) 80 % (v/v) em óleos; (3) e (B) em PDB.

Os ensaios efectuados com plantas de castanheiro *Castanea sativa* Mill *in vitro*, (Figura 21), revelaram que para concentrações de 2 a 10 % (v/v) o desenvolvimento das plantas foi muito semelhante ao controlo, mostrando que os óleos essenciais em meio de cultura não eram tóxicos, não comprometendo o desenvolvimento normal e micropropagação de *Castanea sativa* Mill (Figura 22).

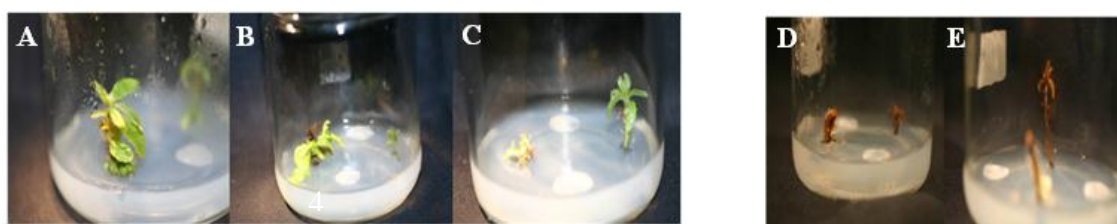


Figura 22. Imagem das plantas *in vitro* após 4 semanas de crescimento. (A) Controlo em 70 % (v/v) de etanol, (B) 2 % (v/v) (C) 10 % (v/v) em óleo, (D) 50 % (v/v), (E) 100 % (v/v) em óleo.

Em concentrações de 50 a 100 % (v/v) de óleos essenciais as plantas mostraram taxas de mortalidade elevada, principalmente a 100 % (pode chegar a 100 %), (Figura 23).

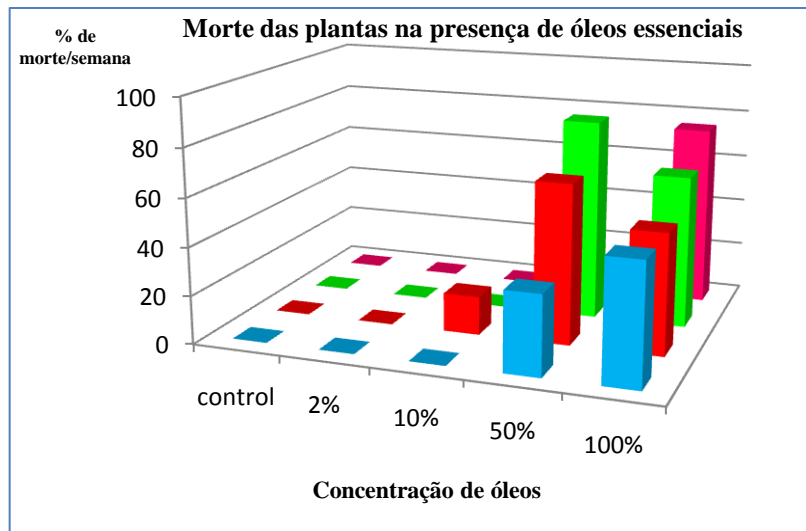


Figura 23. Morte das plantas micropropagadas na presença de óleos essenciais de *Mentha Pulegium*.

Desta, considerando que a amplitude entre concentrações era muito elevada, passando logo para o dobro da concentração (de 50 para 100 %), efectuaram-se ensaios a 80, 90 e 100 % (v/v).

Os resultados obtidos revelaram que para uma concentração de 80 % (v/v) de óleos essenciais de *Mentha pulegium* a planta se mantinha viável, não sendo o seu crescimento afectado (Figura 23).



Figura 23. *Castanea sativa* Mill *in vitro* na presença de 80 % (v/v) em óleos essenciais de *Mentha pulegium*.

5 – Conclusão

Por meio deste trabalho, conclui-se que recorrendo ao uso de técnicas da biologia molecular, é possível, proceder à extracção e amplificação de um gene de interesse, bem como estudá-lo num sistema independente.

Neste estudo a clonagem foi bem sucedida no vector de expressão bacteriano pET28a(+), sendo possível após a indução em meios de cultura observar a expressão heteróloga da proteína GIP em gel de poliacrilamida SDS.

A técnica de PCR em tempo real, permitiu efectuar a quantificação relativa do DNA do gene *gip* em *P. cinnamomi*, revelando ter maior expressão na presença do substrato serrim 0.2 % (v/v).

No que se refere a segunda parte deste trabalho, ensaios feitos com óleos essenciais, foi possível concluir que estes resultados são muito preliminares, mas mostram que os óleos essenciais de *Mentha pulegium* L, podem ser usados no controlo biológico da disseminação de *P. cinnamomi* e desta forma usada como ferramenta no controlo da doença da Tinta na região do Nordeste Transmontano.

Com vista à continuidade deste trabalho sugere-se a clonagem nouro vector e numa levedura visto ser um organismo eucarionte, assim como outros meios indutores para extrair RNA da planta e verificar o comportamento do gene *gip* quando infectada, avaliando a sua resposta por RT-qPCR,

E ainda a transformação de *P. cinnamomi* a fim de silenciar o gene *gip* e verificar qual o impacto/papel na infecção do castanheiro.

No que diz respeito aos óleos essenciais de *Mentha pulegium* L, deveriam ser testados os compostos maioritários em separado de modo a avaliar o impacto de cada um na inibição do crescimento da *P. cinnamomi*, com o objectivo de produzir um fitofármaco para ser utilizado contra a doença da tinta.

6 – Referências Bibliográficas

- Abreu, C.A., Pires, A.L., Pinto, H.G., (1995). Chestnut ink disease. An integrated approach to its control and release of quality improved material. In: NATO/SFF/Po-Chestnut, Report nº 5 May 1 to October 31.
- Anabela Martins., (1997). Micropropagação *in vitro* de plantas micropropagadas de castanheiro (*Castanea sativa* Mill), Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008). Biological effects of essential oils- a review. Food Chem. Toxicol., 46 (2): 446– 475.
- Barrett, S.R., Shearer, B.L., Hardy, G.E., (2003). The efficacy of phosphite applied after inoculation on the colonisation of *Banksia brownii* stems by *Phytophthora cinnamomi*. Australasian Plant Pathol., 32 (1): 1-7.
- Bertand, A., Ducret, J., Debourge, J.C., Horrière, D., (1977). Etude des propriétés d'une nouvelle famille de fongicides: Les monoethyl phosphites métalliques. (caractéristique physicochimique et proprieties biologique. Phytiatr. Phytopharm. Rev. Fr. Med. Pharm.Veg.,26:3-17.
- Bilodeau, G.J., Lévesque, C.A., de Cock, A.W.A. M., Duchaine, C., Brière, S., Uribe, P., Martin, F.N., and Hamelin, R.C. (2007). Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. Phyto., (97):632-642.
- Cahill, D.M., Bennett, I.J., McComb, J.A., (1993). Mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*. Plant Pathol., 42 (6): 865– 872.
- Carvalheira, M.A.G., (1997). Inventariação e Avaliação da Sanidade das Áreas de Castanheiro no Parque Natural de Montesinho. Relatório Final de Estágio. UTAD, Vila Real.
- Clive, M., Brasier Paul A., Beales., Susan, A. Kirk., Sandra Denman., Joa Rose., (2005). *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK, Mycol. Res., 109 (8):853–859.

- Coelho, P., (2009). “Efeito do fosfonato de potássio na protecção das raízes do castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) contra *Phytophthora cinnamomi*”. Dissertação do Curso de Mestrado em Agroecologia. Escola Superior Agrária de Bragança.
- Cortizo, E.V., Madriñán, M.L.V., Madriñán, F.J.V., (1999). O castiñeiro: bioloxía e patoloxía. Consello da Cultura Galega. Santiago de Compostela. 274p.
- Crandall, S.B., (1950). The distribution and significance of the chestnut root rot *Phytophthoras*, *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. Plant Dis. Rep., 34 (6): 194-196.
- Cunha, A.P., Ribeiro, J.A., Roque, O.R., (2007). Plantas aromáticas em Portugal. Caracterização e utilizações. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Cynthia, M.B., Damasceno., John, G., Bishop., Daniel R., Ripoll., Joe Win., Sophien Kamoun., Jocelyn K.C. Rose., (2008). Structure of the Glucanase Inhibitor Protein (GIP) Family from *Phytophthora* Species Suggests Coevolution ith Plant Endo- β -1,3-Glucanases. Mol. Plant –Microbe Interactions., 21 (6):820-830.
- Dick, M.W., (1995). The Straminipilous Fungi. A New Classification for the Biflagellate Fungi and Their Uniflagellate Relatives with Particular Reference to Lagenidiaceous Fungi. C. A. B. Internat. Mycol. Pap., Nº 168.
- Elorrieta, J., (1949). El castaño en España. IFIE. Madrid, p333. In: Cortizo, E.V., Madriñán, M.L.V., Madriñán, F.J.V., (1999). O castiñeiro: bioloxía e patoloxía. Consello da Cultura Galega. Santiago de Compostela. 274p.
- Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P.H., (1987). *Phytophthora*, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. APS Press, The American Phytopathological Society, USA.
- Erwin, D.C., Ribeiro, O.K., (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Feijó, J.A., (1989). Propagação de *in vitro* de *Castanea sativa* Mill. Dissertação de Mestrado em Secreção Vegetal e Produtos Naturais Renováveis. Universidade de Lisboa.
- Fernandes, C.T., (1947). A “Doença da Tinta” do Castanheiro em Espanha. Separata das publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas. Vol. XIV Tomo I e II.
- Fernandes, C.T., (1953). A luta contra a “doença da tinta” dos castanheiros no Norte de Portugal. Separata das publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Vol. XX Tomo II: 153-158.

- Fernandes, C.T., (1966). A “Doença da Tinta” dos castanheiros. Parasitas do género *Phytophthora* de Bary. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Alcobaça.
- Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E., (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*, Natick., 26(1):112-125.
- Gent-Pelzer, M.P.E., Brouwershaven, I.R., KOX, L.F.F., Bonants, P.J.M., (2007). A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. *Journal of Phytopathol.*, 155 (6):357-363.
- Gisi, U., Harr, J., Sandmeier, R., Wiedmer, H., (1983). A new systemic fungicide (San 731) against diseases caused by Peronosporales. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.*, (48):541-549.
- Gouveia, E.M., Abreu, C.G., 1994. Avaliação da resistência do castanheiro (*Castanea sativa*) a *Phytophthora cinnamomi*. *Revista Florestal* 7: 3-17.
- Gouveia, M.E., (2004). Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro. Doutoramento em Ciências Agronómicas/Protecção de Plantas, UTAD. Vila Real, 163pp.
- Greslebin, A.G., Hansen, E.M., Sutton, W., (2007). *Phytophthora austrocedrae* sp. nov, a new species associated with *Austrocedrus chilensis* mortality in Patagonia (Argentina). *Mycol. Res.*, 111 (3): 308-316.
- Guimarães, R., Sousa, M.J., Ferreira, Isabel, C.F.R., (2009). Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Industrial Crops and Products.*, 32(2):152-156.
- Hanahan, D., (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol. Biol.*, 166 (4): 557–580.
- Hansen, E.M., Wayne, F., Wilcox F.P., Reeser, W., (2009). *Phytophthora rosacearum* and *Phytophthora sansomeana*, new species segregated from the *Phytophthora megasperma* "complex". *Mycol.*, 101(1):129-135.
- Hardham, AR., (2005). Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Plant. Pathol.*, 6, 589-604.
- Hardy, GES., Barrett, S., Shearer, B.L., (2001). The future of phosphite as a fungicide to control the soilborn plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathol.*, 30, (2):133-139.

- Hayden, H., Ivors, K., Wilkinson, C., Garbelotto, M., (2006). TaqMan Chemistry for *Phytophthora ramorum* detection and quantification, with a comparison of diagnostic methods. *Phyto.*, 96(8):846-854.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6 (10): 986-994.
- <http://www.epa.esa.gov/pesticides/biopesticides>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Ingo Hein., Eleanorm M., Girlroy, Miles Rarmstrong., Paul R.J., Birch., (2009). The zig-zag-zig in oomycete - plant interactions. *Mol. Plant Pathol.*, 10(4):547-562.
- Ippolito, A., Schena, L., Nigro F., Ligorio, I.V.S., Yaseen T., (2004). Real-time detection of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora citrophthora* in citrus roots and soil. *Euro.J.of Plant Patholo.*, 110(8):833-834.
- Kamoun, S., (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44(10):41-60.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., Fritig, B., (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins-Four PR proteins of tobacco have 1,3-beta-glucanase activity. *EMBO.J.*, 6(11):3209-3212.
- Licciardello, G., (2006). Identification and detection of *Phoma tracheiphila*, causal agent of citrus Mal Secco disease, by real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease, Sta. Paul.*, 90 (12):1523-1530.
- Lockey, C., Otto, E., Long, Z., (1998). Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotech.*, 24 (5):744-746.
- Lukens, R. J., Cham, D.C.K., Etter, G., (1978). Ortho 20615, a new systemic for the control of plant diseases caused by Oomycetes. *Phytopathol. News*, 12:142.
- Martins, L.M., Abreu, C.G., Marques, C.P., (1997). Evolução do estado sanitário do castanheiro numa área limítrofe à Serra da Nogueira (Trás-os-Montes). IRATI 97, I Congresso Florestal Hispano-Luso, II Congresso Florestal Español, Pamplona.
- McCarren, K.L., McComb, J.A., Shearer, B.L., Hardy, GES., (2005). The role of chlamydosporos of *Phytophthora cinnamomi* - a review. *Australasian Plant Pathol.*, 34 (3):333-338.
- Michiels, A., Van den Ende W., Tucker M., Van Riet L., Van Laere A., (2003). Chromosomal Walking of Flanking Regions From Short Known Sequences in GC-Rich Plant Genomic DNA. *Plant Mol. Biol. Reporter.*, 21(3):295-302.

- Mine, S.E., Soner S., Kurt, S., (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopath., 161(2): 119–128.
- Navarro Cerrillo, R.M., Terán Bocero, A.I., Sánchez M.E., (2006). Acción preventiva y curativa del fosfonato en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands en encina y alcornoque. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas., 32(4): 685-694.
- Nelson, S.C., Abad, Z.G., (2010). *Phytophthora morindae*, a new species causing black flag disease on noni (*Morinda citrifolia* L) in Hawaii. Mycol., 102 (1):122-134.
- Pimentel, A.A.L., (1947). *Phytophthora cinnamomi* Rands, um outro agente extremamente virulento, da “Doença da Tinta” do Castanheiro. Separata da Agronomia Lusitana, Vol. IX Tomo III. 181-191.
- Quintanilla, P., Rohloff, J., Iversen, T.H., (2002). Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. Potato Res., 45(2):225-235.
- Roberts, D.A., Boothroyd, C.W., (1984). Fundamentals of plant pathology. 2 ed. New York. W.H. Freeman, 432pp.
- Salesses, G., Ronco, L., Chauvin., J.E Chapa, J., (1993). Amélioration génétique du chataignier. Mise au point de tests d'evaluation du comportement vis-à-vis de la maladie de l'encre. L' Arboriculture Fruitiere., 458:23-31.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989). Molecular cloning a laboratory manual. 2ed, New York: Cold Spring Harbor., 1.25.
- Saude, C., Hurtado-Gonzales, O.P., Lamour, K.H., Hausbeck, M.K., (2008). Occurrence and characterization of a *Phytophthora* sp. Pathogenic to asparagus (*Asparagus officinalis*) in Michigan. Phytopathol., 98(10):1075-1083.
- Schwinn, F.J., (1987). New developments in chemical control of *Phytophthora*. In: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., Tsao, P. H., 1987. *Phytophthora*, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. APS Press, The American Phytopathol. Society, USA.
- Schwinn, F.J., Staub, T., Urech, P.A., (1977). A new fungicide against diseases caused by Oomycetes. Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, 42: 1181-1188.
- Serres, J.M., Carraro, G.A., (1976). DPX-3217, a new fungicide for the control of grape downy mildew, potato late blight and other *Peronosporales*. Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent., 41:645-650.

- Shearer, B.L., Tippet, J.T., (1989). Jarrah dieback: The dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the Jarrah (*Eucalytus marginata*) forest of South-Western Australia. Research Bulletin No 3 Dept. of Conservation and Land Management Como Western Australia.
- Stephen, A., Bustin., Vladimir Benes., Jeremy, A., Garson., Jan Hellemans., Jim Huggett., Mikael Kubista., Reinhold Mueller., Tania Nolan., Michael, W., Pfaffl., Gregory L., Shipley., Jo Vandesompele., Carl, T. Wittwer., (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55 (4): 611-622.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemannmerdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B., (1993). Plant pathogens is related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75 (8):687-706.
- Svoboda, K.P., Hampson, J.B., (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- Tyler, BM., Tripathy, S., Zhang X., Dehal P., Jiang R.H., Aerts A., Arredondo F.D., Baxter L., Bensasson D., Beynon J.L., Chapman, J., Damasceno, C.M.B., Dorrance A.E., Dou D., Dickerman A.W., Dubchak, I.L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon S.C, Govers F., Grunwald, N.J., Huang W., Ivors K.L., Jones R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour K.H., Lee, M.K, McDonald, W.H., Medina, M., Meijer, H.J. G., Nordberg, E.K., Maclean, D.J., Ospina- Giraldo, M.D., Morris, P.F., Phuntumart, V., Putnam, N.H., Rash, S., Rose, J.K.C., Sakihama, Y., Salamov, A.A., Savidor, A., Scheuring, C.F., Smith, B.M., Sobral, B.W.S., Terry, A., Torto-Alalibo, T.A., Win, J. Xu. Z., Zhang, H., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S, Boore, J.L., (2006). *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 313 (5791):1261-1266.
- Tyler, BM., (2002). Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their host. *An.Rev. of Phytopathol.*, 40: 127-167.
- Urech, P.A., Schwinn, F.J., Staub, T., (1977). CGA 48988, a novel fungicide for the control o the late blight, downy mildews and related soil-borne diseases. *Proc. 9th British Crop Protection Conference*, 2:623-631.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *An. Rev. of Phytopathol.*, 44:135-162.

- Vidhyasekaran, P., (1997). Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms (Marcel Dekker, Inc.: New York).
- Vieitez, Cortizo, E., Vieitez Madriñán, M.L., Vieitez Madriñán, F.M., (1999). O castiñeiro. Consello da Cultura Galega, Santiago de Compostela, 274 pp.
- Wilkinson, C.J., Holmes, J.M., Tynan, K.M., Colquhoun, I., McComb, J.A., Hardy, G.E., Dell, B., (2001). Ability of phosphite applied in a glasshouse trial to control *Phytophthora cinnamomi* in five plant species native to Western Australia. Australasian Plant Pathology, 30(4): 343-351.
- Williams, D.J., Beach, B.G.W., Horrière, D., Maréchal, G., (1977). LS 74-783, a new systemic fungicide with activity against *Phycomycete* diseases. Proc. Br. Crop.Conf., 9th 2:565-573.
- Yan, H.Z., Liou, R.F., (2006). Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. Fungal Genet and Biology., 43(6):430-438.
- York, W.S., Qin, Q., Rose, J.K., (2004). Proteinaceous inhibitors of endo-beta-glucanases. Biochim. Biophys. Acta 1696:223-233.
- Zentmyer, G.A., (1980). *Phytophthora cinnamomi* and Diseases it causes. Monograph nº 10. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA.
- Zentmyer, G.A., (1987). The World of *Phytophthora*. In: D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P.H. Tsao (Eds.) In: *Phytophthora* its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. APS Press: 167-172.

7 – Anexos

Anexo I: Meios de Cultura, Tampões e Soluções utilizadas

Meio PDA

PDA (Potato Dextrose Agar – HIMEDIA), 39 g/l seguindo-se autoclavagem a 121°C

Meio PDB

PDB-Potato Dextrose Broth (Difco TM), 24 g/l seguindo-se autoclavagem a 121°C

Meio LB (*Luria-Bertani*)

Meio rico para *E.coli*: Para 1 litro:

10 g de triptona

5 g extracto de levedura

10 g NaCl

pH ajustado a 7.5 com NaOH. Esterilização em autoclave, no caso do meio LB-agar foi adicionado 15g de agar e depois de autoclavado procedeu-se ao plequeamento.

Meio Indutores

0.5 g KH_2PO_4

0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 g de Asparagina

1 mg Tiamina

0.5 g Extracto de Levedura

Substrato de indução: Serrim 0.2% (v/v) (extracto de madeira), celulose 0.2 % (v/v) e glucose 2.0% (v/v).

Anexos II: Condições Físicas usadas nas reacções de PCR; Soluções utilizadas para amplificação do DNA por PCR e usadas no controlo da eficiência,

Tabela 1. Programa de PCR utilizado para a amplificação da ORF do gene *gip* com os *primers* SacGIP e HindGIP.

Programa	°C	Tempo	Ciclos
Desnaturação	95	3min	40
Desnaturação	94	1min	
Hibridação	61	1min	
Extensão inicial	72	3min	
Extensão final	72	10min	

Tabela 2. Condições físicas usadas na reacção de qPCR para os genes *gip* e *act 2*.

Desnaturação	95	3min	
Desnaturação	95	30 seg	40x
Hibridação	59	30 seg	
Extensão	72	30 seg	

Amplificação do DNA por PCR

dNTPs (200mM)

Adicionou-se, em tubos tipo *epENDORF* de 0,5ml, 360µl de água destilada, 10µl de dATP, 10µl de dCTP, 10µl de dTTP e 10µl de dGTP. Agitou-se em *vortex* e armazenou-se a -20°C.

Controlo de eficiência do PCR

Gel de agarose 2% (p/v)

Dissolveram-se 0.6 g de agarose em 30 ml de tampão TAE 1×, sob aquecimento e com agitação, até a agarose estar completamente dissolvida. Adicionou-se 1µl de brometo de etídio 5µg/µl.

Gel de agarose 0.8% (p/v)

Dissolveram-se 0.24 g de agarose em 30 ml de tampão TAE 1×, sob aquecimento e com agitação, até a agarose estar completamente dissolvida. Adicionou-se 1µl de brometo de etídio 5 µg/µl.

Solução de Brometo de Etídio

Brometo de Etídio 0,5 µg/ml;

Solução de *Orange G* concentrado (5×)

12,5g Ficoll

0,125g *Orange G*

Dissolveu-se em água destilada e fez-se o volume até 50ml. Armazenaram-se em alíquotas de 2ml a -20°C.

Solução de *Orange G* diluído (1×)

Diluiu-se 100ml de *Orange G* 5× em 400ml de água destilada e armazenou-se a 4°C.